

**Aktivität, Populationsdynamik und Diversität Methan  
oxidierender Bakterien im Reisfeld**

**Dissertation**

zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Gundula Eller  
aus Rahden

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom 01.01.1998 bis zum 31.09.2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von PD. Dr. Peter Frenzel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 14.12.2000

Erstgutachter: PD. Dr. P. Frenzel  
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2001

Ein Grossteil der während der Dissertation erzielten Ergebnisse ist bzw.wird in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Eller, G., S. Stubner und P. Frenzel (2000): Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation. FEMS Microbiology Letters, in press

Eller, G., P. Frenzel. (2000) Changes in activity and community structure of methane oxidising bacteria over the vegetation period of rice. Appl. Environ. Microbiol., submitted Oktober 2000

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	5
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	6
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	8
2.1. Die Gruppe Methan oxidierender Bakterien.....	9
2.2. Methanemissionen aus Nassreisanbau.....	14
2.3. Die Bedeutung von Methanotrophen für die Methanemissionen aus Reisfeldern.....	15
2.4. Zielsetzung.....	17
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	18
<b>3.1. Untersuchungen an Reinkulturen methanotropher Bakterien</b> .....	18
3.1.1. Bakterienkulturen.....	18
3.1.2. Anzucht der Stammkonserven und allgemeine Inkubations- bedingungen für Stammkulturen methanotropher Bakterien .....	18
3.1.2.1. Mineralsalzmedien.....	19
3.1.3. Methoden zur Reinheitskontrolle der Kulturen.....	20
3.1.3.1. Verwendete Komplexmedien für Wachstumstests.....	20
3.1.4. Analyse von organischen Verbindungen im Kulturüberstand Methan oxidierender Bakterien .....	22
3.1.5. Vitalfärbungen .....	23
<b>3.2. Modellsystem Mikrokosmos</b> .....	25
3.2.1. Aufbau der Mikrokosmen, verwendeter Boden und Reispflanzen .....	26
3.2.2. Düngung der Mikrokosmen .....	26
3.2.3. Wachstumsbedingungen der Reispflanzen im Mikrokosmos.....	27
3.2.4. Aufteilung der Mikrokosmen in Kompartimente.....	27
3.2.4.1. Gewinnung des durchwurzelter Bodens .....	28
3.2.4.2. Undurchwurzelter Boden.....	29
3.2.4.3. Wurzeln und Spross für Oxidationsmessungen .....	29
3.2.4.4. Ablösen der Rhizoplane und Gewinnung des Homogenisats .....	29
<b>3.3. Untersuchung von Proben aus einem Reisfeld</b> .....	30
3.3.1. Entnahme von Boden und Wurzeln aus dem Reisfeld.....	32
<b>3.4. Nachweis methanotropher Bakterien und ihrer Aktivität</b> .....	32
3.4.1. Flussmessungen .....	33
3.4.2. Methanoxidation in-situ .....	33
3.4.3. Gasanalytik.....	34

3.4.4. Porenwasseranalytik .....	35
3.4.5. Messung potentieller Methanoxidationsraten in Feld- und Mikrokosmenproben .....	36
3.4.6. Zellzahlbestimmungen .....	37
3.4.7. Ganzzellhybridisierung (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, FISH) .....	38
3.4.7.1. Fixierung der Reinkulturen und Umweltproben .....	41
3.4.7.2. Ganzzell Hybridisierung .....	42
3.4.8. Molekularbiologische Methoden.....	44
3.4.8.1. DNA-Extraktion aus Wurzel- und Bodenproben .....	44
3.4.8.2. DNA-Aufreinigung über Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP).....	45
3.4.8.3. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	46
3.4.8.4. DNA-Amplifikation .....	46
3.4.8.5. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) .....	47
3.4.8.6. Klonierung von DGGE-Banden der 9 $\alpha$ -Amplifikationsprodukte .....	48
3.4.8.7. Sequenzierung von DGGE-Banden und Reinkulturen der Methan oxidierenden Bakterien .....	49
3.4.8.8. Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung.....	50
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Versuche mit Kulturen methanotropher Bakterien .....</b>	<b>52</b>
4.1.1. Vitalfarbstoffscreening und Färbungen mit CTC .....	52
4.1.2. Untersuchungen an Reinkulturen Methan oxidierender Bakterien.....	53
4.1.2.1. Zell- und Koloniemorphologie in Kulturen methanotropher Bakterien.....	54
4.1.2.2. Einschleppung von Verunreinigungen? .....	57
4.1.3. Versuche zur Aufreinigung methanotropher Kulturen .....	58
4.1.4. Partielle Sequenzierung von Kulturen Methan oxidierender Bakterien....	61
4.1.5. Anpassung von FISH für die familienspezifische Detektion Methan oxidierender Bakterien .....	62
<b>4.2. Untersuchungen zur Aktivität und Populationsdynamik Methan oxidierender Bakterien an Reismikrokosmen.....</b>	<b>64</b>
4.2.1. Methanemission und <i>in-situ</i> Methanoxidation.....	64
4.2.2. Entwicklung der Reispflanzen im Mikrokosmos .....	66
4.2.3. Potentielle Methanoxidation in Bodensuspensionen und an Wurzeln verschieden alter Reispflanzen .....	67
4.2.4. Porenwasseranalytik .....	69
4.2.5. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien.....	72

4.2.6. Molekularbiologische Untersuchungen .....	75
4.2.7. Ganzzellhybridisierungen mit familienspezifischen Sonden für Typ I und Typ II Methanotrophe (FISH) .....	84
<b>4.3. Feldversuch zur Populationsdynamik von Methan oxidierenden Bakterien.....</b>	<b>87</b>
4.3.1. Änderung der Methanemission und in-situ Methanoxidation über die Saison.....	87
4.3.2. Änderung der Biomasse der Reispflanzen über die Saison 1999.....	88
4.3.3. Potentielle Methanoxidationsraten im Feldexperiment.....	90
4.3.4. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien über die Saison 1999 .....	93
4.3.5. Molekularbiologische Untersuchungen an Reisfeldproben .....	95
4.3.5.1. Untersuchung zur Dominanz einer Familie der Methano- trophen im Reisfeld.....	105
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>106</b>
<b>5.1. Entwicklung der Aktivität Methan oxidierender Bakterien über die Vegetationsperiode von Reis.....</b>	<b>106</b>
5.1.1. Vergleich der Methanemissionen im Mikrokosmen- und Feldexperiment.....	107
5.1.2. Kurzzeitiger Einfluss der <i>in-situ</i> Methanoxidation auf die Methanemission .....	108
5.1.3. Ist die Aktivität Methan oxidierender Bakterien in Reisfeldern limitiert?	109
<b>5.2. Populationsdynamik Methan oxidierender Bakterien im Reisfeld .....</b>	<b>112</b>
5.2.1. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien über die Vegetationsperiode von Reis, bestimmt nach der MPN-Methode ...	113
5.2.2. Kultivierungsunabhängige Methoden zur Beobachtung der Zellzahl und Aktivität Methan oxidierender Bakterien .....	115
5.2.2.1. Vitalfärbungen von Methan oxidierenden Bakterien.....	116
5.2.2.2. Spezifische Detektion von Methan oxidierenden Bakterien in Umweltproben .....	117
5.2.2.3. Anpassung von FISH für den spezifischen <i>in-situ</i> Nachweis von Typ I und Typ II Methanotrophen.....	120
5.2.2.4. Untersuchungen zur <i>in-situ</i> Dominanz von Typ I oder II im Mikrokosmos mit FISH .....	122
<b>5.3. Diversität der Methan oxidierenden Bakterien im Reisfeld.....</b>	<b>124</b>
5.3.1. Die Entwicklung der Typ II Methanotrophen über die	

---

Vegetationsperiode von Reis .....	125
5.3.2. Analyse der Populationsstruktur von Typ I Methanotrophen über die Vegetationsperiode von Reis .....	128
5.3.3. Vergleich der aus Mikrosomen- und Feldproben erhaltenen Sequenzen des Methanol-Dehydrogenase Gens <i>mxoF</i> .....	131
<b>5.4. Abschliessende Betrachtungen</b> .....	133
5.4.1. Übertragbarkeit der Ergebnisse des Mikrokosmenexperiments auf das Agraökosystem Reisfeld .....	133
5.4.2. Ausblick .....	134
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	136
<b>7. ANHANG 1</b> .....	146

## Abkürzungsverzeichnis

6-CFDA	6-Carboxyfluoreszein Diacetat
CTC	5-Cyano-2,3-di-4-Tolyl-Tetrazoliumchlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalacto-Pyranosid
LB	Klonierungsmedium
MOB	Methan oxidierende Bakterien
MPN	Most Probable Number determination (Wahrscheinlichste Keimzahl)
mxaf	Gen bzw. Primer für die $\alpha$ -Untereinheit der Methanol Dehydrogenase
n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitro Blue Tetrazolium, (2,2'-di-p-Nitrophenyl-5,5'-Diphenyl-3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-Diphenylen)Ditetrazoliumchlorid)
Neotetrazoliumchlorid	2,2',5,5'-Tetraphenyl-3,3',[p-Diphenylen]-Ditetrazoliumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppm <sub>v</sub>	parts per million and volume
SF	Standardfehler
TG	Trockengewicht
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazoliumchlorid
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid



## 1. Zusammenfassung

Die Methan oxidierenden Bakterien können durch die Umsetzung von Methan die Emission dieses Treibhausgases aus gefluteten Reisfeldern deutlich verringern. Um nähere Erkenntnisse über die Aktivität und Populationsstruktur der Methanotrophen im Reisfeld zu erhalten, wurden Mikrokosmos- und Feldexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beiden Systeme waren qualitativ gut vergleichbar. Der positive Einfluss der Reisswurzel auf die Methanotrophen war durch die Kompartimentierung im Mikrokosmos deutlicher nachzuweisen als im Feld. Die *in-situ* Methanoxidation hatte sowohl im Feld als auch im Mikrokosmos nur während der ersten Wochen der Vegetationsperiode Einfluss auf die Methanemissionen. Dagegen blieben die Initialraten in Messungen der potentiellen Methanoxidation in Bodensuspensionen auch nach Abnahme der Aktivität *in-situ* anhaltend hoch. Dies wies auf eine *in-situ* Limitierung der Methan oxidierenden Bakterien hin, die auf einen Mangel an leichtverfügbaren Stickstoffverbindungen zurückgeführt werden konnte.

Die Zellzahl der Methanotrophen nahm während des Wachstums der Reispflanze besonders in Rhizoplane und Homogenisat der Wurzel, aber auch im durchwurzelter Boden zu. Im Mikrokosmos konnte eine *in-situ* Dominanz der Typ II Methanotrophen in allen Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode nachgewiesen werden. Die Zahl der Typ I Methanotrophen erreichte nur in der Rhizoplane Anteile von bis zu 2/3 der Gesamtpopulation. Die Wurzel ist demnach nicht nur für den Erhalt der Grösse, sondern auch der Diversität der Population wichtig. Im Feldversuch wurden beide Familien in vergleichbaren Zellzahlen nachgewiesen.

Die Populationsstruktur wies trotz des Wachstums der Methanotrophen keine ausgeprägten Änderungen auf. Für Typ I wurden beide Gattungen (*Methylosinus* und *Methylocystis*) nachgewiesen, während für Typ II nur zur Gattung *Methylobacter* ähnliche Sequenzen gefunden wurden. Die Dominanz von *Methylobacter* könnte auf einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Typ I Gattungen zurückzuführen sein. Da Reisfelder periodisch trocken gelegt werden, erhalten diejenigen Bodenbakterien einen Vorteil, die Trocknungsstress überstehen können. *Methylobacter* ist die einzige Typ I Gattung mit einem trockenungsresistenten Dauerstadium und auch beide nachgewiesenen Typ II Gattungen bilden entsprechende

Dauerstadien. Diese Fähigkeit ermöglichte es ihnen, im Reisfeld zu überdauern und verdeutlichte so die selektiven Auswirkungen der Physiologie auf die Populationsstruktur der Methan oxidierenden Bakterien.

## 2. Einleitung

Methan oxidierende Bakterien (Methanotrophe) können Methan mit molekularem Sauerstoff umsetzen und ihren Zellkohlenstoff sowie Energie aus diesem Substrat gewinnen (Whittenbury *et al.* 1970a, Hanson und Hanson 1996, Bowman 1999). Die Umsetzung des leicht verfügbaren und preiswerten Rohstoffs Methan in hochwertiges Zellmaterial führte während der siebziger Jahre zu grossem Interesse an den Methanotrophen: Die "Single Cell Protein" (SCP) Produktion versprach, eine neue Ernährungsgrundlage zu erschliessen. Durch Schwierigkeiten im Fermentationsprozess und bei der Aufreinigung des Zellmaterials wurde die SCP-Produktion jedoch nicht in grossem Rahmen eingeführt. Während dieser Zeit wurden allerdings viele neue Arten von Methanotrophen isoliert und charakterisiert. Whittenbury und Mitarbeiter (1970a) schlugen eine taxonomische Einteilung für diese Bakteriengruppe vor, die grundsätzlich auch heute noch gilt (siehe unten). Der ungewöhnliche Stoffwechsel der Methanotrophen ist auch im Hinblick auf den Abbau von Schadstoffen (z.B. halogenierte Kohlenwasserstoffe) untersucht worden (Sullivan *et al.* 1988).

Ein weiterer wichtiger Aspekt, auf den in dieser Arbeit näher eingegangen wird, ist die Verringerung von Emissionen des wichtigen Treibhausgases Methan durch die Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien. Methan wird von methanogenen Archaea als Endprodukt im biologischen Abbau organischer Verbindungen unter anaeroben Verhältnissen gebildet (Conrad 1999). Methan oxidierende Bakterien brauchen sowohl dieses Endprodukt der anaeroben Abbaukette als auch Sauerstoff für ihr Wachstum und treten daher bevorzugt an oxisch/anoxischen Grenzschichten auf.

Solche Grenzschichten gibt es in vielen natürlichen Ökosystemen, wie z.B. Feuchtgebieten oder Seen, so dass die Methan oxidierenden Bakterien weitverbreitet sind. Diese Standorten sind durch hohe Methankonzentrationen gekennzeichnet. Die bekannten Reinkulturen von Methan oxidierenden Bakterien zeigen eine Substrataffinität für Methan, die zu den für diese Standorte hoher Methankonzentration bestimmten Werten passt (Joergensen und Degn 1983, King 1994, Schnell und King 1995). Methanoxidation wurde aber auch in verschiedenen Böden nachgewiesen (z.B. Wald, Acker und Grünland (Bender und Conrad 1992, Roslev *et al.* 1997), in denen Methan in der Regel nur in niedrigen Konzentra-

tionen (atmosphärisches Mischungsverhältniss von 1,8 ppm<sub>v</sub>) vorkommt. Es ist bisher nicht erwiesen, ob diese hochaffine Methanoxidation durch noch nicht isolierte Methanotrophe erfolgt oder eine Anpassung der bekannten Methanotrophen an Standorte niedriger Methankonzentrationen darstellt (Bender und Conrad 1992, Dunfield *et al.* 1999).

Methan oxidierende Bakterien kommen auch in anthropogenen Standorten, wie z.B. Mülldeponien und Reisfeldern, vor und tragen durch die Umwandlung von Methan in Kohlendioxid und Zellmaterial zur Verringerung der Emissionen dieses Treibhausgases bei. Um gezielten Einfluss auf die Methanoxidation nehmen und damit eventuell die Methanemissionen verringern zu können, sind genauere Kenntnisse der methanotrophen Lebensgemeinschaften nötig.

## 2.1. Die Gruppe Methan oxidierender Bakterien

Die Verwertung von Methan als Kohlenstoff- und Energiequelle ist allen Methan oxidierenden Bakterien gemeinsam. Damit unterscheiden sie sich auch von den methylotrophen Bakterien, die ein breiteres Spektrum an C<sub>1</sub>-Verbindungen umsetzen können, jedoch kein Methan (Hanson *et al.* 1992). Methanotrophe brauchen für ihren Stoffwechsel molekularen Sauerstoff und können ausser Methan auch Methanol als Substrat nutzen (Whittenbury *et al.* 1970a, Bowman 1999).

Methan oxidierende Bakterien sind Gram negativ und kommen in den unterschiedlichsten Zellformen vor (Kokken, Stäbchen, vibroide Zellen). Die Ausbildung von Dauerstadien (Exosporen und Zysten) ist in dieser Bakteriengruppe weit verbreitet. Durch den Übergang von vegetativen Zellen in Dauerstadien anderer Morphologie (z.B. Stäbchen zu rundlichen Zysten) treten in Reinkulturen methanotropher Bakterien häufig verschiedene Zellformen parallel auf.

Die meisten Methanotrophen wachsen auf Mineralsalzagar und unter Zugabe von Methan zu runden, erhabenen Kolonien auf, die zunächst meist beigefarben sind, wobei die Farbe während der Ausbildung von Dauerstadien häufig dunkler (gelblich bis braun) wird. Es gibt auch typische pigmentierte Methanotrophe, wie z.B. *Methylobacter methanica*, der rosa farbene Kolonien bildet oder *Methylobacter luteus*, der gelb pigmentiert ist (Hanson *et al.* 1992, Bowman 1999).

Die Methanotrophen werden in zwei Familien unterteilt, die *Methylococcaceae*,

auch als Typ I und die *Methylocystaceae*, auch als Typ II bezeichnet. Die Typ I Methanotrophen umfassen die Gattungen *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylobacterium*, *Methylococcus*, *Methylosphaera* und *Methylocaldum*, zu Typ II gehören *Methylosinus* und *Methylocystis* (Bowman *et al.* 1993, Bowman 1999). Auch die neu beschriebene Gattung *Methylocella*, die aus Torf isoliert wurde und bei niedrigeren pH-Werten wächst als die bisher bekannten Methanotrophen, wird zu den Typ II Methanotrophen gezählt (Dedysh *et al.* 2000). Diese Gattung ist allerdings phylogenetisch nicht näher verwandt zu den Typ II Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis*, sondern stimmt in der 16S rDNA-Sequenz eher mit *Beijerinckia* überein.

Nach phylogenetischer Analyse von 16S rDNA-Sequenzen wurden die Typ I Methanotrophen den  $\gamma$ -Proteobakterien und Typ II den  $\alpha$ -Proteobakterien zugeordnet. Die Familien unterscheiden sich auch durch weitere Eigenschaften, wie z.B. den Stoffwechselweg, der für die Assimilation des Kohlenstoffs verwendet wird. Typ I Methanotrophe nutzen den Ribulose-Monophosphat-Weg (RuMP), während Typ II den Serin-Weg nutzen (Hanson und Hanson 1996, Bowman 1999).

Bis auf die Gattung *Methylocella* bilden alle Methanotrophen ein intracytoplasmatisches Membransystem aus (Whittenbury *et al.* 1970a, Hanson und Hanson 1996, Bowman 1999, Dedysh *et al.* 2000). Es wird angenommen, dass dieses Membransystem für die Umsetzung von Methan nötig ist, da es bei einem Wachstum der Bakterien auf Methanol nicht immer nachzuweisen ist (Green 1992). Die Anordnung dieser intrazellulären Membranen wird als weiteres Kriterium zur Differenzierung von Typ I und Typ II Methanotrophen genutzt. Typ I Gattungen enthalten Membranstapel, während die Membranen in Typ II Gattungen entlang der Cytoplasmamembran angeordnet sind.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der beiden Familien ist die Form des Enzyms Methan-Monooxygenase, mit dessen Hilfe Methan zu Methanol oxidiert wird. Alle Methanotrophen – bis auf *Methylocella* – besitzen die Gene für eine membrangebundene (partikuläre) Methan-Monooxygenase, während nur Typ II sowie einige Ausnahmen unter den Typ I Methanotrophen (*Methylococcus*, einige *Methylomonas* Arten) eine lösliche (soluble) Methan-Monooxygenase ausbilden.

Weitere physiologische Unterschiede der Familien sind ein unvollständiger (Typ I) oder vollständiger (Typ II) Tricarbonsäure Zyklus, sowie die Fähigkeit (Typ II und

*Methylococcus*) zur Fixierung molekularen Stickstoffs (Hanson und Hanson 1996, Bowman 1999). Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über wichtige physiologische und morphologische Merkmale der Methan oxidierenden Bakterien.

Tabelle 2.1: Zusammenstellung wichtiger Merkmale von Typ I und Typ II Methanotrophen

Gattung	phylogenetische Einordnung	Dauerstadien	Tricarbon- säurezyklus	Kohlenstoff- assimilation	Gene für N <sub>2</sub> Fixierung	Anordnung Intrazellulärer Membranen
<i>Methylomonas</i>	γ-Proteobakterien	unreife Zysten	unvollständig	RuMP <sup>2)</sup>	nicht vorh. <sup>3)</sup>	stapelförmig
<i>Methylobacter</i>	γ-Proteobakterien	Azotobacter-ähnl. Zysten <sup>1)</sup>	unvollständig	RuMP	nicht vorh.	stapelförmig
<i>Methylococcus</i>	γ-Proteobakterien	unreife Zysten	unvollständig	RuMP	vorhanden	stapelförmig
<i>Methylosinus</i>	α-Proteobakterien	Exosporen	vollständig	Serin-Weg	vorhanden	entlang Cytoplasmamembran
<i>Methylocystis</i>	α-Proteobakterien	Lipid-Zysten	vollständig	Serin-Weg	vorhanden	entlang Cytoplasmamembran

<sup>1)</sup> ähnl. = ähnlich, <sup>2)</sup> RuMP = Ribulose-Monophosphat-Weg, <sup>3)</sup> vorh. = vorhanden

Die physiologischen Unterschiede der Methanotrophen könnten auch unterschiedliche Anpassungen an wechselnde Umweltbedingungen zur Folge haben. Im komplexen Agrarökosystem Reisfeld treten Änderungen verschiedener Umweltparameter (wie z.B. Witterung, Wachstum der Reispflanzen) auf, die Veränderungen der Populationsstruktur und Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien bewirken könnten. Eine bessere Kenntnis der Lebensgemeinschaft der Methanotrophen und eventueller Änderungen über die Vegetationsperiode ist daher für ein Verständnis des komplexen Agrarökosystems Reisfeld notwendig. Dies könnte auch Bemühungen, die Methanoxidation im Reisfeld oder anderen Systemen anzuregen und damit die Methanemissionen zu reduzieren, erleichtern.

## **2.2. Methanemissionen aus Nassreisanbau**

Methan ist durch seine hohe spezifische Absorption von Wärmestrahlung (Infrarot) ein sehr wichtiges Treibhausgas. Es absorbiert 32 mal mehr infrarote Strahlung als Kohlendioxid (Enquete-Kommission 1990). Zusätzlich wird durch die photochemischen Abbaureaktionen von Methan mit Hydroxylradikalen in der Tropo- und Stratosphäre die Umsetzung anderer wichtiger Treibhausgase wie z.B. Stickoxide, Ozon und Wasserdampf negativ beeinflusst (Crutzen 1994, Enquete-Kommission 1990). Der Anstieg der atmosphärischen Methankonzentrationen während der letzten 200 Jahre (von ca. 0,5 ppm<sub>v</sub> in präindustriellen Zeiten auf heute 1,8 ppm<sub>v</sub>) ist überwiegend auf anthropogene Aktivitäten zurückzuführen (Sass *et al.* 1992b, Law und Nisbet 1996, Milich 1999). Wichtige anthropogene Quellen für Methan sind z.B. die Nutzung fossiler Brennstoffe, die Biomasseverbrennung und Mülldeponien; sowie die landwirtschaftlichen Quellen Viehhaltung (Wiederkäuer) und Reisanbau (Cicerone und Oremland 1988, Schütz *et al.* 1990, Crutzen 1991, Conrad 1997).

Für rund die Hälfte der Weltbevölkerung ist Reis das wichtigste Grundnahrungsmittel und wird weltweit auf einer Fläche von über 145 Millionen Hektar angebaut (IRRI 1991, Minami und Neue 1994). Bisher werden nur ca. 50 % der gesamten Flächen im Nassreisanbau bewirtschaftet, diese liefern aber mehr als zwei Drittel der globalen Reisproduktion. Die gefluteten Reisfelder tragen bisher mit 20 – 100 Tg Methan pro Jahr bis zu 25 % zur globalen Methanemission bei (Wahlen *et al.* 1989, Wassmann *et al.* 1993, IPCC 1994, Minami und Neue 1994, Neue 1997).



Um den Bedarf der wachsenden Bevölkerung zu decken, müsste der Reisertrag in den Jahren bis 2020 um über 60 % gesteigert werden (Cassman *et al.* 1998). Diese Produktionssteigerung kann nur durch eine Intensivierung des Anbaus auf den vorhandenen Flächen erreicht werden (IRRI 1989). Wegen der höheren Erträge des Nassreisanbaus im Vergleich zu Tiefwasseranbau oder Trockenfeldanbau ist für eine solche Ertragssteigerung eine Ausdehnung der Flächen des Nassreisanbaus nötig. Damit würde sich auch die Methanemission aus Reisfeldern erhöhen und diese Quelle für atmosphärisches Methan an Bedeutung gewinnen. Die Methanemission aus Reisfeldern könnte durch die Förderung der mikrobiellen Methanoxidation verringert werden. Die Methan oxidierenden Bakterien und ihre Aktivität im Reisfeld gewinnt demnach immer grössere Bedeutung für den weltweiten Methanhaushalt.

### **2.3. Die Bedeutung von Methanotrophen für die Methanemissionen aus Reisfeldern**

Wie oben aufgeführt benötigen Methan oxidierende Bakterien Methan und Sauerstoff für ihren Stoffwechsel. Durch die im Wasser verringerte Diffusion von Sauerstoff kommt es im gefluteten Reisfeldeboden rasch zu einer Sauerstofflimitierung der Mikroorganismen. Nach Verbrauch des noch im Boden und Porenwasser enthaltenen Restsauerstoffs durch aerobe Mikroorganismen läuft eine charakteristische Kette von anoxischen und anaeroben Stoffwechselvorgängen (Nitrat-atmung, Eisen- und Mangan-Reduktion, Sulfat-atmung, Methanogenese) im Boden ab (Ponnamperuma 1972, Peters und Conrad 1996, Frenzel *et al.* 1999). Endprodukt der anaeroben Stoffwechselkette ist Methan, dass durch methanogene Archaea gebildet wird. Es verteilt sich durch Diffusion im gesamten Boden und wird über die Bodenoberfläche und durch die Reispflanze in die Atmosphäre abgegeben (Schütz *et al.* 1989, Butterbach-Bahl *et al.* 1997). Die Oberfläche des gefluteten Bodens ist also eine oxisch/anoxische Grenzschicht, durch die das Methan aus dem Boden in das Flutwasser und der Sauerstoff aus dem Flutwasser in die Bodenoberfläche diffundieren. Zusätzlich wird im Flutwasser durch die Algen photosynthetisch Sauerstoff produziert. Die Bodenoberfläche ist im gefluteten Reisfeld daher ein bevorzugtes Habitat für Methan oxidierende Bakterien. Aber auch im überwiegend anoxischen Reisfeldeboden sind oxische Bereiche

vorhanden: Die Reisswurzel wird durch die Pflanze über ein Aerenchymssystem mit Sauerstoff für die Zellatmung versorgt (Butterbach-Bahl *et al.* 1997, Aulakh *et al.* 2000). Dabei kommt es zur radialen Sauerstoffabgabe über die Wurzeloberfläche in den umgebenden Boden, so dass oxische Bereiche um die Wurzeln herum entstehen (Armstrong 1971, Flessa und Fischer 1992, Arth und Frenzel 2000).

Methanotrophe sind in Reisfeldboden und auch an und in Reisswurzeln nachgewiesen worden (Bosse und Frenzel 1997 und 1998, Gilbert und Frenzel 1995 und 1998, Bodelier *et al.* 2000a und b, van Bodegom 2000), aber bislang ist über ihre Populationsstruktur und -dynamik während der Vegetationsperiode von Reis nur wenig bekannt. Frühere Untersuchungen ergaben, dass die Methanemissionen aus Reisfeldern saisonale Schwankungen aufwiesen (Schütz *et al.* 1989, Chanton *et al.* 1997, Khalil *et al.* 1998a und b). Ob diese saisonalen Schwankungen mit der Aktivität der Methanotrophen verknüpft sind oder nur auf Änderungen in der Methanproduktion beruhen, konnte bisher nicht gezeigt werden. Es wurde allerdings von einer Oxidation von bis zu 90 % des produzierten Methans im Wurzelraum der Reispflanzen berichtet, was die Bedeutung der Methanotrophen im Reisfeldboden unterstreicht (Holzapfel-Pschorn *et al.* 1986, Schütz *et al.* 1989, Gilbert und Frenzel 1995, Denier van der Gon und Neue 1996, Krüger *et al.* 2000).

## 2.4. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob ein Wachstum der Methanotrophen über die Vegetationsperiode von Reis stattfindet und in welchem Kompartiment es bevorzugt auftritt. Es sollte untersucht werden, ob mit diesem Wachstum auch eine Änderung der Populationsstruktur verbunden ist und ob solche Änderungen mit dem Vorhandensein oder der Abwesenheit notwendiger Substrate – wie z.B. Sauerstoff oder Methan – korreliert werden können. Weiterhin sollten die verschiedenen Kompartimente des Reisfelds hinsichtlich der in ihnen vorliegenden Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien untersucht werden. Durch einen Vergleich der *in-situ* Aktivität im Feld mit der potentiellen Aktivität in Wurzel- und Bodenproben sollte zudem gezeigt werden, ob die potentielle Oxidationsaktivität Rückschlüsse auf die *in-situ* Aktivität zulässt. Ein weiterer Aspekt der Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft war die Frage, ob sich die physiologischen Unterschiede der beiden Familien - z.B. in der Fähigkeit zur Stickstofffixierung oder der Ausbildung unterschiedlicher Dauerstadien - in ihrer Verteilung und Dominanz im Reisfeld widerspiegeln. Schliesslich sollte der Vergleich der im Modellsystem Mikrokosmos erhaltenen Ergebnisse mit denen eines Feldversuchs die Frage klären, ob sich die Verhältnisse im Agrarökosystem wirklich im Gewächshaus simulieren lassen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurde eine Kombination von Aktivitätsmessungen mit mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden in einem Mikrokosmos- und einem Feldversuch angewandt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Untersuchungen an Reinkulturen methanotropher Bakterien

Ziel der Untersuchungen an Reinkulturen der Methan oxidierenden Bakterien war die Entwicklung einer Methode, die den spezifischen Nachweis einzelner Zellen der beiden Familien der Methanotrophen im natürlichen Habitat sowie möglichst auch eine Einschätzung ihres Aktivitätszustands erlaubt.

##### 3.1.1. Bakterienkulturen

Die verwendeten Kulturen wurden zunächst der Stammsammlung des MPI Marburg entnommen. Es handelte sich um die Isolate RP1, RP2 und P4 aus Reisfeldboden bzw. von Reiswurzeln (Gilbert 1997) sowie um Kultivate der Stämme *Methylosinus sporium*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylocystis parvus*, *Methylobacter album*, *Methylobacter whittenburyi*, *Methylomonas methanica* und *Methylococcus capsulatus*.

Ergänzend und zur Kontrolle wurden neue Kulturen aus den Stammsammlungen der American Type Culture Collection (ATCC) und The National Collections of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) untersucht: *Methylosinus sporium* (NCIMB 11130), *Methylosinus trichosporium* OB3b (ATCC 35070, NCIMB 11131), *Methylocystis parvus* (NCIMB 11129), *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128) und *Methylomonas methanica* (ATCC 35067, NCIMB 11130), *Methylomicrobium album* (NCIMB 11123) sowie *Methylobacter luteus* (Subkultur von NCIMB 11914, zur Verfügung gestellt von P. Bodelier, Netherlands Institute of Ecology, Centre for Limnology, Maarssen, NL) und *Methylococcus capsulatus* (Subkultur von NCIMB 11853, zur Verfügung gestellt von B. Bendinger, DVGW-Forschungsstelle, TU Hamburg-Harburg, BRD).

##### 3.1.2. Anzucht der Stammkonserven und allgemeine Inkubationsbedingungen für Stammkulturen methanotropher Bakterien

Sowohl die bei 4 °C gelagerten als auch die in -80 °C konservierten institutseigenen Stämme wurden zunächst auf Nitrat- (NMS) und Ammoniummineral-salzmedien (AMS) (modifiziert nach Whittenbury *et al.* 1970a, siehe unten) über-

impft. Sofern nicht anders angegeben erfolgten alle Inkubationen mit einer Atmosphäre aus 20 % Methan in Raumluft bei 25 °C im Dunkeln und geschüttelt (120 Upm). Das den Kulturen zugesetzte Methan wurde durch Membranfilter (Rotrandfilter, Porenweite 0,2 µm, Schleicher & Schüll) steriltfiltriert.

Gefriergetrocknete Stammkonserven wurden gemäss der Anleitung der Stammsammlungen vorkultiviert.

### 3.1.2.1. Mineralsalzmedien

Das Nitratmineralsalzmedium (**NMS**) enthielt 1 g l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> und 0,54 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Der pH-Wert wurde mit 5 N Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt. Bei Verwendung als Festmedium wurden 15 g l<sup>-1</sup> Agar Noble zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden diesem Grundmedium 2 ml l<sup>-1</sup> SL10a-Spurenelementlösung, 1 ml l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>- Stammlösung (0,8 M in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) und 1 ml l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung (0,1 M in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) zugefügt. Die Spurenelementlösung SL10a nach Widdel wurde wie bei Hanson *et al.* (1992) beschrieben aus den folgenden Bestandteilen angesetzt:

HCl	50 mM
FeCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	5 mM
ZnCl <sub>2</sub>	0,5 mM
MnCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 mM
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,5 mM
CuCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,01 mM
NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,15 mM.

Dazu wurde zunächst das Eisenchlorid in 25 ml 2 M Salzsäure gelöst. Anschliessend wurden alle weiteren Verbindungen zugegeben und auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde in 50 ml Portionen aliquotiert und in fest verschlossenen Gefässen autoklaviert.

Das Ammoniummineralsalzmedium (**AMS**) hatte die gleiche Zusammensetzung wie das NMS-Medium, enthielt allerdings 0,5 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl statt 1 g l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>. Ein direkter Vergleich der Mineralsalzmedien ergab, dass die Stämme auf NMS flüssig am besten wuchsen. Für die Stammhaltung wurde daher NMS-Medium verwendet.

### 3.1.3. Methoden zur Reinheitskontrolle der Kulturen

Eine charakteristische Eigenschaft methanoxidierender Bakterien ist die Hemmung ihres Wachstums durch hohen Gehalt des Mediums an organischen Verbindungen (Hanson *et al.* 1992). Die Reinkulturen wurden daher auf verschiedene Komplexmedien überimpft und ihr Wachstum überprüft.

Die Zellmorphologie der in Flüssig- und Festmedien gewachsenen Kulturen wurde mikroskopisch (Lichtmikroskop Zeiss Axiophot) im Lebendpräparat (1000-fache Vergrößerung, Ölimmersion, Phasenkontrast) untersucht. Die Koloniemorphologie von Agarkulturen wurde mit einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Zeiss) festgestellt.

#### 3.1.3.1. Verwendete Komplexmedien für Wachstumstests

Zur Untersuchung des Wachstums der Methanotrophen auf Komplexmedien wurde Standard I Bouillion und -Agar verwendet (siehe unten). Zusätzlich wurden Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und -konzentrationen zur Anreicherung nicht methanotropher Begleitorganismen aus diesen Kulturen ausgewählt.

#### Standard I Bouillion und -Agar

Ein Standardmedium zur Kultivierung aerober heterotropher Bakterien ist das Standard I Medium, das 3 g l<sup>-1</sup> Fleischextrakt und 5 g l<sup>-1</sup> Pepton enthält. Dieses wurde in der oben angegebenen Konzentration und 1/10 konzentriert verwendet.

#### Pepton-Glucose Agar

Dieses Medium wird zur Anreicherung von *Acetobacterium* und *Gluconobacterium* Stämmen verwendet. *Acetobacter methanolicus* ist eine fakultativ methylotrophe Art dieser Gruppe, die in Kulturen von Methanotrophen wachsen könnte. Dieses Komplexmedium diente parallel zum Standard I Medium zur Anreicherung heterotropher Mikroorganismen. Es hatte folgende Zusammensetzung: 5 g l<sup>-1</sup> Bacto-Pepton, 20 g l<sup>-1</sup> Glucose, 1 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 15 g l<sup>-1</sup> Bacto Agar.

#### Pedomicrobium-Medium

Die Gruppe der dimorphen, prosthecaten Bakterien (*Caulobacter*, *Hypho-*

microbium, Pedomicrobium) ist ubiquitär verbreitet. Diese Gruppe wächst bevorzugt bei geringen Konzentrationen organischer Substrate und überdauert auch Zeiten ohne C-Quelle problemlos. Diese Eigenschaften ermöglichen ihnen auch ein Leben in Kulturen methanoxidierender Bakterien, in denen sie Zellbruchstücke und / oder Stoffwechselprodukte der Methan oxidierenden Bakterien als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen könnten. Stämme der methylotrophen Hyphomicrobien wurden häufig in Assoziation mit Methanotrophen gefunden (z.B. Hanson *et al.* 1992, Calhoun und King 1998). Für ihre Anreicherung wurde ein Medium mit den folgenden Bestandteilen verwendet: 10 mM Na-Acetat, 0,05 % Hefeextrakt, 0,2 % Stärke, 15 g l<sup>-1</sup> Bacto Agar, pH 9,0.

### **Glycerin-Pepton Agar**

Dieses Medium wird zur Kultivierung der methylotrophen Bakteriengruppe *Methylobacterium* verwendet und hatte die Zusammensetzung: 10 g l<sup>-1</sup> Glycerin, 10 g l<sup>-1</sup> Pepton, 15 g l<sup>-1</sup> Bacto Agar, pH 7,0.

### **Methanol als Kohlenstoffquelle**

Zusätzlich wurde für die Anreicherung methylotropher Stämme NMS-Medium unter Zusatz von Methanol eingesetzt. Dies erfolgte in zwei verschiedenen Varianten: a) Zugabe von sterilfiltriertem Methanol (Endkonzentration 5 mM) in flüssiges NMS-Medium oder b) Methanolversorgung der Mikroorganismen über eine mit Methanol angereicherte Atmosphäre. Für Variante b) wurden NMS-Agarplatten beimpft und zusammen mit einem geöffneten, Methanol enthaltenden Erlenmeyerkolben in gasdichten Gefäßen (Anaerobentopfen) in einer Atmosphäre aus Raumluft inkubiert.

### **AC-Medium**

Das AC-Medium diente zur unspezifischen Anreicherung heterotropher Mikroorganismen. Es wurde 1/10 konzentriert verwendet, um Bakterien anzureichern, die bevorzugt bei geringen Konzentrationen organischer Verbindungen wachsen. Das unverdünnte Fertigmedium hatte folgende Zusammensetzung: 20 g l<sup>-1</sup> Pepton (proteolytisch), 3 g l<sup>-1</sup> Fleischextrakt, 3 g l<sup>-1</sup> Malzextrakt, 5 g l<sup>-1</sup> Dextrose, 0,2 g l<sup>-1</sup> Ascorbinsäure, 1 g l<sup>-1</sup> Agar, pH 7,2. Um ein wirklich festes Medium zu erhalten, wurden 14 g l<sup>-1</sup> Agar zugesetzt.

### **Kulturüberstand methanotropher Bakterien**

Die in den Reinkulturen vermuteten Begleitorganismen der Methan oxidierenden Bakterien können unter den verwendeten Inkubationsbedingungen nur auf ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten der Methanotrophen oder auf organischen Verunreinigungen des Mediums wachsen. Da die Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte nicht bekannt ist, wurde versucht, die Begleitorganismen auf Kulturüberstand der Methanotrophen anzureichern. Dieser wurde nach mehrwöchiger Inkubation von Methanotrophen in flüssigem NMS-Medium entweder durch Abzentrifugieren der Zellen (15 min 13000 x g) oder durch Abfiltrieren durch Filtermembranen (0,2 µm Porenweite) gewonnen. Dieser Kulturüberstand wurde nach Autoklavieren als Medium verwendet oder unautoklaviert ohne weiteres Inokulum inkubiert.

#### **3.1.4. Analyse von organischen Verbindungen im Kulturüberstand Methan oxidierender Bakterien**

Zur genaueren Charakterisierung der Bestandteile des Kulturüberstands von Methanotrophen wurde eine RP1-Kultur in NMS-Flüssigmedium täglich beprobt. Die Proben wurden abzentrifugiert (5 min, 13000 × g) und sterilfiltriert, bevor sie über „High performance liquid chromatography“ (HPLC) analysiert wurden. Die hier verwendete HPLC ermöglichte die Bestimmung von organischen Verbindungen wie Zuckern, Fettsäuren und Alkoholen. Zur HPLC-Anlage gehörten eine Pumpe (SP1000) und ein Säulenofen (S4110), beides von Sykam (Gilching). Die Probenaufgabe erfolgte mit einem Autosampler (Jasco 851-AS, Jasco, Japan). Weitere Parameter des Systems sind in der folgenden Auflistung zusammengefasst.

Säule	Edelstahlsäule, Länge 30 cm, Durchmesser 7,8 mm
Trägermaterial	ORH-801 Ion-exclusion form, H <sup>+</sup> (Interaction, Vertrieb Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Flussmittel	1 mM Schwefelsäure
Flussrate	0,8 ml min <sup>-1</sup>
Ofentemperatur	60 °C



Detektoren	RI-Detektor (Brechungsindex) Erc-7512 (Erma, Japan), Betriebstemperatur 40°C UV-Detektor Linear UVIS 200, Wellenlänge 205 nm
Auswertung	Peak Simple (SRI-Instruments, Torrence USA)

### 3.1.5. Vitalfärbungen

Zur Bestimmung der Vitalität einzelner Zellen sind Kultivierungstechniken oft nicht ausreichend. Viele Zellen gehen unter Stressbedingungen in einen Zustand über, in dem sie nicht mehr kultivierbar, aber dennoch lebensfähig sind (Oliver 1993, Nybroe 1995). Um die Entwicklung der Lebensfähigkeit von Zellen unter physiologischem Stress verfolgen zu können, wurden daher verschiedentlich sogenannte Vitalfärbungen angewandt (Kaprelyants und Kell 1993, Thom *et al.* 1993, Walsh *et al.* 1995, Joux *et al.* 1997, Marsh *et al.* 1998). Diese beruhen auf der Umsetzung eines Farbstoffvorläufermoleküls durch Stoffwechselfunktionen der Zelle in einen Farbstoff. Zur Detektion der Lebensfähigkeit einzelner Zellen ist es vorteilhaft, wenn dieser Farbstoff innerhalb der Zelle angereichert wird.

Da nicht jeder Farbstoffvorläufer von allen Bakterienstämmen gleich gut umgesetzt wird, war es erforderlich, mit einer Auswahl von Reinkulturen aus der Gruppe der Methan oxidierenden Bakterien verschiedene Vitalfarbstoffe und Färbemethoden zu testen. Es wurden folgende Stämme aus der institutseigenen Stammsammlung eingesetzt:

RP1	Typ II
<i>Methylosinus sporium</i>	Typ II
<i>Methylosinus trichosporium</i>	Typ II
<i>Methylocystis parvus</i>	Typ II
<i>Methylobacter whittenburyi</i>	Typ I (siehe dazu aber Kapitel 4.1.4 und 5.2.2.3)

Die verwendeten Farbstoffe gehörten hauptsächlich zur Gruppe der Tetrazoliumsalze, die in der Atmungskette umgesetzt werden. Zusätzlich wurde der Farbstoff 6-CFDA (6-Carboxyfluoreszein Diacetat) verwendet, der durch Esterasen gespalten wird und im Vergleich zum in der Bodenmikrobiologie gebräuchlichen Farbstoff FDA (Fluoreszein Diacetat) weniger stark aus den Zellen diffundieren soll (Yamaguchi und Nasu 1997). Es wurden sowohl fluoreszierende als auch nicht fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die zusammenfassend in Tabelle 3.1 auf-

geführt sind.

**Tabelle 3.1: Für die Vitalfärbungen verwendete Farbstoffe und ihre Konzentrationen.** Die vollständigen Bezeichnungen der einzelnen Farbstoffe sind im Abkürzungsverzeichnis angegeben.

Vitalfarbstoff	Stammlösung	Konzentration im Färbeansatz
CTC	25 mM in H <sub>2</sub> O dest	5 mM
INT	5 mM in H <sub>2</sub> O dest	1 mM
TTC	5 mM in H <sub>2</sub> O dest	1 mM
NBT	25 mM in H <sub>2</sub> O dest	5 mM
Neotetrazoliumchlorid	25 mM in H <sub>2</sub> O dest	5 mM
6-CFDA	7 mM in Methanol	14 bzw. 28 µM

Zusätzlich wurden verschiedene Färbebedingungen verglichen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Flüssigkeits- und Gasvolumina (2 ml Zellsuspension in 27 ml Druckglasröhrchen oder 1 ml Zellsuspension in 2 ml Probegläschen für die Gaschromatographie (GC)) wurde die für den Gasaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche variiert, welche für die Versorgung der Methanotrophen mit Methan und Sauerstoff von grosser Bedeutung ist. Neben dem Volumen der Färbeansätze wurde die Dauer der Färbereaktion variiert. Vitalfärbungen wurden bisher hauptsächlich mit schnellwachsenden und sehr stoffwechselaktiven Bakterien (z.B. Enterobacteriaceae), aber auch mit verschiedenen Mischkulturen durchgeführt. Zur Färbung dieser Zellen reichten kurze Inkubationen (0,5 - 1 h) aus (Smith und McFeters 1996 und 1997, Cook und Garland 1997, Yamaguchi und Nasu 1997). Da Methanotrophe im Vergleich z.B. zur Familie der Enterobacteriaceae eher langsam wachsen, wurden die Färbeansätze parallel für 0,5 h, 2 h und 20 h inkubiert.

Ein weiterer Vergleich wurde zwischen vor der Färbung abzentrifugierten und in frischem Medium resuspendierten Zellen, sowie direkt im Wachstumsmedium gefärbten Zellen durchgeführt. Durch den Ausatusch des Mediums sollte eine unspezifische Reduktion des Farbstoffes und damit das Auftreten unspezifischer Fluoreszenzen verhindert werden. Methanotrophe könnten allerdings durch die Zentrifugation gehemmt werden, so dass ein Vergleich zentrifugierter und

unzentrifugierter Ansätze nötig war.

Die Farbstoffe wurden den Zellsuspensionen in den in Tabelle 3.1 angegebenen Endkonzentrationen zugefügt. Die Färbung erfolgte unter Zusatz von 20 % Methan in die Atmosphäre, geschüttelt (120 Upm) bei 25 °C im Dunkeln. Als positive Kontrolle der Färbungen diente eine *Escherichia coli* Kultur (gewachsen auf Standard I Bouillion), zur Negativkontrolle wurden mit 3,7% Formaldehyd (mindestens 10 min Einwirkungszeit) abgetötete Kulturen verwendet. Bei den Färbungen mit 6-CFDA wurden die Kulturen durch Aufkochen abgetötet und die Färbereaktion durch Kühlen der Ansätze auf Eis gestoppt, da die Reaktion der Esterasen durch Formaldehyd nicht gehemmt wird.

Fluoreszenzmarkierte Zellen wurden mit Auflichtfluoreszenz und den in der folgenden Tabelle aufgeführten Filtersets am Zeiss Axiophot untersucht.

**Tabelle 3.2: Für Fluoreszenzmikroskopie verwendete Filtersets**

Fluoreszenzfarbstoff	Filterset
DAPI	Zeiss 02 (G 365, FT 395, LP 420)
CTC	BP 546, FT 580, LP 590
6-CFDA	Zeiss 10 (450-490, FT 510, 515-565)

Zur „Schnellkontrolle“ der Färbungen wurden Feuchtpräparate mikroskopiert. Da die Zellen in dieser Art von Präparat nicht räumlich fixiert waren, war ein Auszählen nicht möglich. Um dieses Problem zu lösen, wurden die Zellen nach erfolgter Färbung auf Membranfilter auffiltrierte und mikroskopiert. Für fluoreszierende Farbstoffe wurden lichtundurchlässige, nicht fluoreszierende Membranfilter (Porenweite 0,2 µm, Nucleopore Track-Etch Membrane), für nicht fluoreszierende Farbstoffe Cellulose-Nitrat-Membranen (Porenweite 0,1 µm, Schleicher & Schüll) verwendet. Cellulose-Nitrat-Filter werden durch Einbetten in Immersionsöl lichtdurchlässig, so dass Hellfeldmikroskopie möglich wird.

### 3.2. Modellsystem Mikrokosmos

Zur Untersuchung der Populationsdynamik, Aktivität und Diversität der Methan oxidierenden Bakterien im Reisfeld wurde neben einem Feldversuch während der Saison 1999 am italienischen Reisforschungsinstitut „Istituto Sperimentale della

Cerealicoltura“ in Vercelli, Norditalien, zunächst ein vereinfachtes Modellsystem verwendet, kompartimentierte Mikrokosmen. Diese Mikrokosmen bestanden aus einem inneren und einem äusseren Zylinder, die beide mit Reisfeldboden gefüllt wurden. Durch das Wachstum der Pflanzen im inneren Zylinder wurde ein stark durchwurzelter Bodenkompartment erhalten, dass in direktem Stoffaustausch mit dem undurchwurzelten Boden des äusseren Zylinders stand. Diese Anordnung simulierte die im Reisfeld auftretende vertikale Trennung von durchwurzelter Boden (obere Bodenschicht) und undurchwurzeltem Boden (untere Bodenschicht).

### 3.2.1. Aufbau der Mikrokosmen, verwendeter Boden und Reispflanzen

Die verwendeten Mikrokosmen wurden am “Netherlands Institute of Ecology, Centre for Limnology” in Maarssen entwickelt und freundlicherweise von P. Bodelier für diese Versuche zur Verfügung gestellt. Sie waren aus Edelstahl gefertigt und hatten eine Höhe von 12 cm und einen Durchmesser von 9 cm. Zur Abtrennung des durchwurzelten vom undurchwurzelten Boden wurde zentral ein perforierter Zylinder (Durchmesser 4 cm, Löcher 1 mm) eingesetzt (Bodelier *et al.* 1997 und 1998), der mit zwei Schichten Nylonmonofilament (Nytal P25, Porenweite 45 µm, Bückmann GmbH) überzogen wurde. Im inneren und äusseren Zylinder wurde je ein Porenwassersammler (Membranporendurchmesser 0,2 µm) vertikal installiert, wie bei Bodelier *et al.* (1997, 1998) beschrieben.

Der verwendete **Boden** stammte von Reisfeldern des italienischen Reisforschungsinstituts in Vercelli, die bei Holzappel-Pschorn *et al.* (1986) näher charakterisiert worden sind. Der Boden wurde im Frühjahr 1998 vor dem Fluten der Reisfelder entnommen, bei Raumtemperatur getrocknet, gemahlen und anschliessend auf eine Korngrösse <2 mm gesiebt. Jeder Mikrokosmos wurde mit insgesamt 600 g Reisfeldboden befüllt, wobei 495 g in den äusseren und 105 g in den inneren Zylinder eingewogen wurden.

Die **Reispflanzen** (*Oryza sativa*, Typ *japonica*, Varietät KORAL) wurden 10 bis 14 Tage bei 25 °C im Gewächshaus vorgekeimt und anschliessend in den inneren Zylinder der seit 10 Tagen mit Wasser überstauten Mikrokosmen ausgepflanzt.

### 3.2.2. Düngung der Mikrokosmen

Die Düngung der Mikrokosmen wurde nach der während der Feldsaison 1998 in

Vercelli, Norditalien verwendeten Nährstoffmenge ausgerichtet. In 1998 wurden auf das Feld 162 kg ha<sup>-1</sup> Stickstoff, 138 kg ha<sup>-1</sup> Thomasphosphat (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) und 156 kg ha<sup>-1</sup> Kaliumoxid (K<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ausgebracht. Die Umrechnung der in Kilogramm pro Hektar angegebenen Mengen in Milligramm pro Kilogramm Trockengewicht Boden erfolgte nach Gleichung (1), die von Granli und Boeckman (1994) angegeben wurde.

$$1 \text{ kg N ha}^{-1} = \frac{h \times \text{Ps}}{10} \left[ \frac{\text{mg N}}{\text{kg}_{\text{TG}} \text{ Boden}} \right] \quad (1)$$

mit: h     Höhe der Bodensäule [cm]

Ps     Dichte des Bodens [g cm<sup>-3</sup>]

Bei einer Einwaage von 600 g trockenem Boden ergab sich eine Füllhöhe der Mikrokosmen von etwa 9 cm. Die Dichte des gesiebten Bodens wurde von Bosse (1995) auf 1,5 g cm<sup>-3</sup> bestimmt. Mit diesen Werten wurde nach der Umrechnung der Nährstoffmengen auf ihren Gehalt an N, K und P die Konzentrationen für die Düngelösung berechnet. Für insgesamt 13 Wochen Wachstum sollte die Gesamtmenge von 160 kg N ha<sup>-1</sup> erreicht werden. Die Düngelösung enthielt 5,5 g l<sup>-1</sup> Harnstoff, 4,2 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 3,4 g l<sup>-1</sup> KCl. Einmal wöchentlich wurden 2 ml Düngelösung pro Mikrokosmos mit 100 ml Giesswasser aufgebracht. Da die Pflanzen durchschnittlich etwa 200 ml Wasser pro Tag benötigten, war mit einer Aufnahme der Düngelösung ins Innere des Mikrokosmos innerhalb von 12 Stunden zu rechnen.

### 3.2.3. Wachstumsbedingungen der Reispflanzen im Mikrokosmos

Die Mikrokosmen wurden in einer Phytokammer mit einem Tag-/ Nachtrhythmus von je 12 Stunden inkubiert. Während der beleuchteten Phase wurden eine Temperatur von 25 °C, 70 % Luftfeuchtigkeit und Lichtintensitäten von 0,22 bis 0,55 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> eingestellt. Nach dem Abdunkeln wurde auf 20 °C abgekühlt.

Die Lichtintensität wurde mit einem Mikrovolt Integrator vom Typ MV 2 (Umweltanalytische Produkte) gemessen.

### 3.2.4. Aufteilung der Mikrokosmen in Kompartimente

Die Mikrokosmen wurden nach verschiedenen Wachstumsperioden der Pflanzen

geerntet, d.h. in die zu untersuchenden Kompartimente aufgeteilt. Das Alter der Pflanzen wurde ausgehend vom Tage des Auspflanzens (= Pflanzenalter 0 Tage) definiert und berücksichtigt die 10 Tage Vorkeimen nicht. Um die biologische Varianz zwischen den verschiedenen Pflanzen darzustellen, wurden für 28, 57 und 92 Tage alte Pflanzen je vier parallele Mikrokosmen bearbeitet. Zusätzlich wurde je eine Pflanze nach 20, 38 und 71 Tagen und zwei nach 85 Tagen geerntet, um die zeitlichen Zwischenräume über MPN, DGGE und FISH genauer untersuchen zu können. Im einzelnen wurden mit den Proben die in Tabelle 3.3 zusammengefassten Untersuchungen durchgeführt.

**Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Untersuchungen an 28, 57 und 92 Tage alten Mikrokosmen**

Kompartiment	Potentielle Methanoxidation	MPN	FISH	DGGE
undurchwurzelter Boden	X	X	X	X
durchwurzelter Boden	X	X	X	X
Wurzel ("intakt")	X		X	X
Spross	X			
Rhizoplane		X	X	X
Homogenisierte Wurzel (ohne Rhizoplane)		X	X	X

#### 3.2.4.1. Gewinnung des durchwurzelten Bodens

Der Boden des inneren Zylinders der Mikrokosmen war bei älteren Pflanzen so stark durchwurzelt, dass er zusammen mit den Wurzeln der Pflanze aus den Mikrokosmen gelöst wurde. Die Wurzeln wurden in autoklaviertem Leitungswasser in zwei Stufen mit jeweils 125 ml Wasser abgespült und die so erhaltenen Bodensuspensionen vereinigt. Diese "Ursprungssuspension" wird im Weiteren als durchwurzelter Boden bezeichnet. Sie wurde für Messungen der potentiellen Methanoxidation verwendet und aliquotiert für spätere molekularbiologische Untersuchungen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für MPN und FISH wurde die Ursprungssuspension mit autoklaviertem Leitungswasser 1:100 verdünnt und zum Ablösen der Zellen von Bodenpartikeln 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

#### **3.2.4.2. Undurchwurzelter Boden**

Nach Entnahme des Wurzelzylinders mit dem darin enthaltenen Boden konnte der undurchwurzelte Boden aus den Mikrokosmen in ein Becherglas eingewogen und mit der gewünschten Menge Wasser versetzt werden. Um die Bodenmenge in dieser Suspension möglichst derjenigen in der Suspension des durchwurzelten Bodens anzugleichen, wurden etwa 140 g feuchten Bodens mit 250 ml Wasser versetzt (Ursprungssuspension). Die weitere Bearbeitung erfolgte wie oben für den durchwurzelten Boden dargestellt.

#### **3.2.4.3. Wurzeln und Spross für Oxidationsmessungen**

Nach Gewinnung der Suspension des durchwurzelten Bodens wurden die Wurzeln unter fließendem Leitungswasser von Bodenresten befreit, mit Papier abgetupft und Aliquots möglichst unversehrter Wurzeln für die Oxidationsmessungen und die Ablösung der Rhizoplane eingewogen.

Als Spross wurden in dieser Arbeit die unteren 5 cm der Reispflanze, gemessen vom Wurzelansatz, bezeichnet. Dieser wurde unter fließendem Leitungswasser gründlich abgespült, trocken getupft, in Stückchen von 0,1 - 0,5 cm Länge zerschnitten und für die Oxidationsmessungen eingewogen.

#### **3.2.4.4. Ablösen der Rhizoplane und Gewinnung des Homogenisats**

Zur Gewinnung der Rhizoplane wurden die gewaschenen Wurzeln in eine 150 ml Serumflasche eingewogen und jeweils die 10-fache Menge Wasser und autoklavierte Glasperlen (Durchmesser 1 mm) zugefügt. Diese Mischung wurde mindestens 30 min bei 25 °C auf einem Horizontalschüttler mit 180 Upm geschüttelt. Der Überstand wurde dekantiert und als Rhizoplane-Suspension bezeichnet. Dieser wurde unverdünnt für MPNs, Zellfixierung und molekularbiologische Untersuchungen weiterverwendet.

Zur Gewinnung des Homogenisats wurden die Wurzeln nach dem Dekantieren der Rhizoplane-Suspension entnommen, unter Leitungswasser abgespült und trocken getupft. Anschliessend wurden sie in Stückchen von 3 - 5 mm Länge zerschnitten und abgewogen. Zum Gesamtgewicht der Wurzelmasse wurde das 10-fache an autoklaviertem Leitungswasser zugegeben und die Wurzeln für 2 min im Mixer (Buddeberg) zerkleinert. Die so erhaltene Suspension wurde als Homogenisat

bezeichnet und unverdünnt für MPNs, Zellfixierung und molekularbiologische Untersuchungen verwendet.

### **3.3. Untersuchung von Proben aus einem Reisfeld**

Vergleichbare Untersuchungen wie für das Modellsystem Mikrokosmos dargestellt wurden auch an einem Reisfeld durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden während der Saison 1999 am italienischen Reisforschungsinstitut (Istituto Sperimentale della Cerealicoltura, Vercelli, Nord Italien) vorgenommen. Auf diesem Feld wurde Reis der Varität KORAL ausgesät. Die Feldbearbeitung während der Saison ist in Tabelle 3.4 zusammengefasst, die aus Krüger (2000) übernommen wurde.



**Tabelle 3.4: Übersicht über die Bearbeitung des Versuchsfeldes in Vercelli während der Saison 1999, sowie über wichtige Wuchsstadien der Reispflanzen (Krüger 2000)**

<b>Zeitpunkt 1999</b>	<b>Feldbearbeitung/Pflanzenstadium</b>
01.04.	Düngung zur Beschleunigung des Reisstrohabbaus im Boden (26 kg ha <sup>-1</sup> N als Kalziumcyanamid)
19.-23.04.	Pflügen und Eggen des Feldes
23.04.	Hauptdüngung und Einarbeitung in den Boden (100 kg ha <sup>-1</sup> N in Form von Harnstoff, 150 kg ha <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> O <sub>5</sub> und 80 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in Form von Thomasphosphat)
05.05.	Fluten des Feldes
06.05.	Aussaat (Kreiselstreuer) der Varietät KORAL
21.-31.05.	Trockenfallen des Feldes infolge von Problemen mit der Wasserversorgung
16.-20.06.	Trockenlegung des Feldes zur Abtötung des Algenbewuchses und zur Vorbereitung der Pestizidausbringung
08.-24.06.	Seitentriebbildung der Reispflanzen
19.06.	Pestizidausbringung: Propanil "STAM-F34" Rohm und Haas; Azimsulfuron "GULLIVER", DuPont
14.07.	letzte Düngung (40 kg ha <sup>-1</sup> N (Harnstoff), 104 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Thomasphosphat))
01.-10.08.	Blüte der Reispflanzen
25.08.	Offizielles Ende der Wasserversorgung
07.09.	Trockenfallen des Feldes (Wasserstand überwiegend 0 cm)
30.09.	Reisernte, Felder bleiben unbehandelt bis zum Frühling

Für den Feldversuch wurde die gleiche Berechnung für das Pflanzenalter gewählt wie im Mikrokosmenexperiment. Da im Feld der Reis ausgesät wurde, wurde der

Zeitpunkt 10 Tage nach Aussaat (entsprechend 10 Tagen Vorkeimen im Mikrokosmenexperiment) als Nullwert für das Pflanzenalter definiert.

### **3.3.1. Entnahme von Boden und Wurzeln aus dem Reisfeld**

Die Bodenproben aus dem Reisfeld wurden mit verschliessbaren Stechzylindern aus Edelstahl (Durchmesser 7 cm, Gesamthöhe 26 cm) entnommen. Die mit diesen Zylindern erhaltenen Bodenkerne hatten eine Höhe von ungefähr 10 cm. Als durchwurzelter Boden wurde die obere Bodenschicht (etwa 0,5 bis 3 cm Tiefe) bezeichnet, da diese starke Durchwurzelung zeigte. Der vom unteren Ende der Bodensäule (ca. 10 cm bis 3 cm Tiefe) entnommene Boden enthielt kaum Wurzeln und wurde als undurchwurzelter Boden bezeichnet. Pro Probenahmezeitpunkt wurden drei Bodenkerne gestochen und parallel bearbeitet. Die Ursprungssuspensionen der Bodenproben wurden in einem Verhältnis von Feuchtgewicht Boden zu Wasser wie 1:2 angesetzt. Nach Entnahme von Wurzeln wurden diese Suspensionen für die Messung der potentiellen Methanoxidation aliquotiert. Ein Teil der Suspensionen wurde für spätere molekularbiologische Untersuchungen eingefroren. Für MPN-Analytik und FISH wurden die Suspensionen 1:100 mit autoklaviertem Leitungswasser verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt, um die Zellen von den Bodenpartikeln abzulösen.

Zur Gewinnung der Wurzeln wurden die Pflanzen im Feld vorsichtig mit den Händen ausgegraben, um einen möglichst kompletten Wurzelballen der Pflanze zu erhalten. Die Wurzeln wurden unter fließendem Wasser gründlich gewaschen und anschliessend wie für die Mikrokosmen dargestellt weiterbehandelt. Im Feldexperiment wurden die Wurzeln mehrerer Pflanzen vereinigt, um ausreichend Material zu erhalten. Im allgemeinen wurden drei parallele Ansätze mit Wurzeln von je 6 – 10 Pflanzen untersucht. Für 20 Tage alte Pflanzen wurde nur ein Ansatz mit den Wurzeln von 21 Pflanzen untersucht.

## **3.4. Nachweis methanotropher Bakterien und ihrer Aktivität**

Zur Untersuchung der Populationsstrukturen und -Entwicklung methanotropher Bakterien wurden Untersuchungen von Prozessparametern, klassische Zellzahlbestimmungen und molekularbiologische Ansätze kombiniert.

Die am relativ unbeeinflussten System durchgeführten Flussmessungen und die

Porenwasseranalytik dienten der Bestimmung der im natürlichen System vorliegenden tatsächlichen Aktivität, sowie der Bestimmung von Umgebungsbedingungen der Bakterien.

### 3.4.1. Flussmessungen

Für die Messung der Methanflüsse wurden im Mikrokosmenexperiment Flusskappen (Glas, Gasraumvolumen ca. 2 l) über die Mikrokosmen gestülpt und über eine Gummidichtung luftdicht verschlossen. Im oberen Teil der Flusskappen befanden sich Ventilatoren, die für eine gleichmässige Durchmischung des Gasraumes sorgten. Die Beprobung erfolgte in Abständen von 20 min fortlaufend über 2 h. Es wurden je 1 ml Gasproben durch ein Siliconseptum in der Mitte der Flusskappen entnommen und sofort mittels Gaschromatographie (ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID)) auf den Methangehalt analysiert.

Die Umrechnung der relativen Zunahme des Methangehalts im Gasraum auf die Methanemission pro Mikrokosmos erfolgte nach Gleichung (2).

$$\text{Methanfluss } [\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}] = \frac{\text{ppm}_v [\text{min}^{-1}] \times 60 \text{ min} \times V_{\text{FK}}}{\text{Molvolumen ideales Gas} \times A} \quad (2)$$

mit:  $V_{\text{FK}}$       Volumen Flusskammer [l]  
 $A$             überdeckte Bodenoberfläche [ $\text{m}^2$ ]  
 $\text{ppm}_v$        $\mu\text{l l}^{-1}$

Die Mikrokosmen hatten eine Oberfläche von  $0,00636 \text{ m}^2$ . Das Volumen der verwendeten Flusskappen betrug 1,933 bis 1,98 l. Im Mikrokosmenexperiment wurden die Methanflüsse wöchentlich an vier Pflanzen gleichen Alters bestimmt.

Für die Flussmessungen im Reisfeld wurden Plexiglaskammern verwendet, die eine Bodenfläche von  $0,25 \text{ m}^2$  abdeckten und in ähnlichen Intervallen wie für die Mikrokosmen dargestellt beprobt wurden. Diese Messungen wurden von Krüger (2000) durchgeführt und ausführlich dargestellt.

### 3.4.2. Methanoxidation in-situ

Zur Bestimmung der Methanoxidation *in-situ* wurde der spezifische Inhibitor  $\text{CH}_2\text{F}_2$  verwendet. Dieser gasförmige Inhibitor bewirkt eine Hemmung der Methanoxidation im System ohne die Methanproduktion zu beeinflussen (Matheson *et al.* 1997;

Miller *et al.* 1998). Die *in-situ* Methanoxidation wurde alle zwei Wochen parallel zu den Flussmessungen an vier zusätzlichen Mikrokosmen bestimmt. Der Inhibitor wurde direkt nach Aufsetzen der Flusskappen zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) injiziert (Krüger 2000). Die Messung der Methankonzentrationen erfolgte in Abständen von 20 min über einen Zeitraum von 2 h, wie für die Flussmessungen beschrieben. Nach Umrechnung der Messwerte in Methanemissionsraten und Mittelwertbildung wurde der Anteil der Methanoxidation an der Gesamtemission wie in Gleichung (3) angegeben berechnet.

$$\text{Anteil Oxidation [\%]} = 100 - \frac{\text{Steigung ohne Inhibitor}}{\text{Steigung mit Inhibitor}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.4.3. Gasanalytik

Für die Methanmessungen wurde ein Gaschromatograph vom Typ 9300 A (SRI Instruments) und ein Gaschromatograph GC-8A der Firma Shimadzu verwendet. Beide wurden unter den folgenden Bedingungen betrieben:

Injektor	120 °C (Shimadzu) / Raumtemperatur (SRI)
Säule	Hayesep D (120 °C)
Detektor	FID (120 °C)
Trärgas	N <sub>2</sub>
Brenngase	H <sub>2</sub> , synthetische Luft (20,5 % O <sub>2</sub> in N <sub>2</sub> )
Auswertung	Programm Peak Simple (SRI Instruments)

Die relativen Peakflächen der GC-Messungen wurden mit Hilfe von Gleichung (4) und Eichgasmessungen in Methankonzentrationen umgerechnet.

$$\text{CH}_4\text{-Probe [ppm}_v\text{]} = \frac{\text{PF}}{\text{EG}} \times \text{EG [ppm}_v\text{]} \quad (4)$$

mit: PF Peakfläche Probe

EG Peakfläche Eichgas

Die Sauerstoffkonzentrationen wurden mit einem Gaschromatographen vom Typ 9300 A der Firma SRI Instruments bestimmt, der mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) ausgestattet war. Hier erfolgte eine Abschätzung der Sauerstoffkonzentration im Ansatz im Vergleich zu Kalibrierungen gegen Raumluft.

Säule	Hayesep D (60°C)
Detektor	TCD (60°C)
Trärgas	He
Auswertung	Programm Peak Simple (SRI Instruments)

#### 3.4.4. Porenwasseranalytik

Die Umgebung der im Boden lebenden Bakterien wird entscheidend durch das Porenwasser beeinflusst. Daher ermöglicht die Porenwasseranalytik Aussagen über die im natürlichen System vorliegenden Umweltbedingungen und Rückschlüsse auf ablaufende Prozesse.

In den Mikrosomen wurde je ein Porenwassersammler im durchwurzelten und undurchwurzelten Boden installiert. Diese wurden einmal wöchentlich mit Hilfe von Vakuumröhrchen (Venoject, Terumo) beprobt. Die Röhrchen wurden vor der Beprobung der Porenwassersammler mit N<sub>2</sub> gespült und Vakuum aufgezogen. Es wurden zunächst ca. 2 ml Porenwasser entnommen und verworfen. Anschließend wurden 1 - 2 ml Porenwasser in 3 ml Röhrchen gezogen und das Restvakuum mit Luft ausgeglichen. Über die Gewichts Differenz der befüllten und unbefüllten Röhrchen wurde die genaue Menge des entnommenen Porenwassers bestimmt.

Die **Methankonzentration** im Porenwasser wurde über die Messung des in der Gasphase der Röhrchen enthaltenen Methans bestimmt. Die Umrechnung erfolgte über Gleichung (5).

$$\text{Gas}_{(\text{ges.})} = \text{Gas}_{(\text{gelöst})} + \text{Gas}_{(\text{gasf.})} = \left( \frac{\alpha \times m \times P_v}{M_v} \right) + \left( \frac{m \times G_v}{M_v} \right) [\mu\text{mol}] \quad (5)$$

mit: $\alpha$	Löslichkeitskoeffizient (Bunsenkoeffizient)
$M$	Mischungsverhältnis Gasphase [ppm <sub>v</sub> ]
$P_v$	Proben-/Flüssigkeitsvolumen [l]
$M_v$	Molvolumen ideales Gas (24,78 l mol <sup>-1</sup> bei 25 °C)
$G_v$	Gesamtgasvolumen Ansatz [l]

Für diese Berechnungen kann der Term "Gas<sub>(gelöst)</sub>" für Methan wegen des sehr kleinen Bunsenkoeffizienten ( $\alpha$ ) vernachlässigt werden.

Anschliessend wurden die Röhrchen geöffnet, der **pH-Wert** (pH-Meter Schott CG 840 B, Elektrode Mettler/Toledo InLab 427) des Porenwassers bestimmt und dieses bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für spätere Ammoniumanalytik gelagert.

Die **Ammoniumkonzentrationen** wurden mit einem Orion pH/mV-Ionenmeter (EA940, Colora Messtechnik), ausgestattet mit einer gassensitiven Elektrode (NH 500/2, WTW) gemessen. Dazu wurden die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Porenwasserproben bei Raumtemperatur aufgetaut, 400  $\mu\text{l}$  Probe mit 4 ml 10 M Natronlauge versetzt und direkt anschliessend unter Rühren gemessen.

#### **3.4.5. Messung potentieller Methanoxidationsraten in Feld- und Mikrokosmenproben**

Messungen der potentiellen Methanoxidation wurden vergleichend mit Proben aus dem Mikrokosmenexperiment und über eine Vegetationsperiode (1999) mit Proben aus einem Reisfeld in Vercelli vorgenommen. Es wurden die Kompartimente durchwurzelter und undurchwurzelter Boden sowie Wurzeln untersucht. Im Mikrokosmenexperiment wurden zusätzlich Messungen am Pflanzenspross vorgenommen. Die Bodenproben wurden in je drei parallelen Ansätzen (20 g Bodensuspension in 150 ml Serumflaschen, Naturgummi Stopfen) gemessen. Die Wurzeln wurden - je nach verfügbarer Wurzelmenge - auf zwei oder drei parallele Ansätze (25 ml Serumflaschen, Butylgummi Stopfen) aufgeteilt. Da im Feldversuch die Wurzeln mehrerer Pflanzen vereinigt wurden, konnten Mengen von je 6 g Feuchtgewicht pro Oxidationsansatz erreicht werden, so dass hier drei Parallelen in 150 ml Serumflaschen gemessen wurden. Allen Ansätzen wurde Methan (4.5, Messer-Griesheim) in einer Endkonzentration von 10000  $\text{ppm}_v$  in Raumluft zugegeben. Nach 30 min Equilibration ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 120 Upm, Wurzeln ungeschüttelt) wurde die erste Gasprobe entnommen (Nullwert). Während der folgenden acht Stunden wurde in Abständen von 2 h beprobt und dieser Rhythmus am nachfolgenden Tag fortgesetzt. Die Gasproben wurden mit gasdichten Spritzen entnommen und gaschromatographisch (FID) gemessen. Die Messungen erfolgten bis zu Methan-Volumenkonzentrationen unter 500  $\text{ppm}_v$ . Anschliessend wurde das Trockengewicht der Proben bestimmt ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 - 48 h) und die Oxidationsraten in  $\mu\text{mol}$  Methan pro Gramm Trockengewicht [ $\mu\text{mol CH}_4\text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$ ] berechnet.

Da die Ansätze mit Spross und Wurzeln einen hohen Sauerstoffverbrauch und parallel eine lange Lag-Phase (siehe unten) der Methanoxidation aufwiesen, wurde in diesen Ansätzen zusätzlich zu Methan- einmal täglich die Sauerstoffkonzentration bestimmt (TCD). Bei Konzentrationen unter 10 %  $O_2$  (v/v) wurden 1 - 2 ml reiner Sauerstoff in die Ansätze injiziert.

Durch lineare Regression der Methanabnahme über die Inkubationszeit wurden Initialrate, induzierte Rate und die sogenannte Lag-Phase der Methanoxidation bestimmt. Mit Initialrate wurde hier die Rate der Methanoxidation in der Zeit vom Beginn der Messung bis zur schnellen, induzierten Abnahme der Methankonzentration bezeichnet. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden für Initial- und induzierte Rate definiert die Lag-Phase, die also die Dauer von Beginn der Messung bis zum Einsetzen der induzierten Oxidation beschreibt.

#### **3.4.6. Zellzahlbestimmungen**

Die Zellzahl der methanoxidierenden Bakterien wurde über die Methode der wahrscheinlichsten Keimzahl (most probable number, MPN) bestimmt. Im Mikrokosmenexperiment wurden für die drei Zeitpunkte 28, 57 und 92 Tage nach dem Auspflanzen je vier parallele Mikrokosmen untersucht. Zusätzlich wurde je ein Mikrokosmos nach 21, 38, 71 und 85 Tagen nach Auspflanzen bearbeitet. Im Feldexperiment wurden je Probenahmezeitpunkt drei parallele Bodenkerne und drei Wurzelproben (Ausnahme 20 Tage nach dem Auspflanzen, Kapitel 3.3.1) untersucht. Jede Probe wurde in acht Parallelen in Mikrotiterplatten (8 x 12 Vertiefungen, Sarstedt) ausverdünnt. Je Vertiefung wurden 100  $\mu$ l Ammonium-Mineralsalzmedium (AMS, Kapitel 3.1.2.1) vorgelegt. Die Verdünnung der Proben erfolgte in Schritten von 1:2. Die Mikrotiterplatten wurden in Anaerobentöpfen bei 25 °C im Dunkeln für 3 - 4 Wochen inkubiert. Es wurden parallel Ansätze mit Zugabe von 20 % (v/v) Methan und ohne Zugabe von Methan (Mikrokosmenversuch: synthetische Luft mit 20,5 %  $O_2$  in  $N_2$ ) inkubiert. Die ohne Methan inkubierten Ansätze dienten zur Kontrolle auf heterotrophes Wachstum, dass durch einen Restgehalt an organischen Verbindungen verursacht werden könnte. Das Wachstum in diesen Kontrollansätzen hörte mindestens drei Verdünnungsstufen früher auf als in den mit Methan inkubierten Ansätzen, so dass die berechnete Zellzahl der Methan oxidierenden Bakterien sicher auf Wachstum mit Methan zurückzuführen

war. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der von Rowe *et al.* (1977) angegebenen Tabelle für zweifache Verdünnungsstufen und acht Parallelen zunächst pro Gramm Trockengewicht. Diese Werte wurden anschliessend auf die Masse der Kompartimente umgerechnet. Dazu wurden im Mikrokosmenexperiment die Bodeneinwaagen (undurchwurzelter Boden = 495 g, durchwurzelter Boden = 105 g) herangezogen, während im Feldversuch die Bodenmenge über die Oberfläche ( $r = 3,5 \text{ cm}$ ) und Höhe (3 cm für durchwurzelten und 7 cm für undurchwurzelten Boden) der verwendeten Bodensäule sowie das für Feldboden bestimmte mittlere Bodentrockengewicht ( $1,45 \text{ g cm}^{-3}$ ) abgeschätzt wurde (undurchwurzelter Boden = 391 g, durchwurzelter Boden = 167 g). Für die Wurzelkompartimente wurde die für den jeweiligen Zeitpunkt bestimmte Wurzelmasse einer Reispflanze eingesetzt.

Die Ergebnisse der MPN-Bestimmungen wurden angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der gleichalten Pflanzen, ohne Berücksichtigung der Standardabweichung der 8 Parallelen einer Verdünnungsreihe.

#### **3.4.7. Ganzzellhybridisierung (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, FISH)**

Zum spezifischen Nachweis einzelner Zellen in ihrem Mikrohabitat wurde eine Methode der Ganzzellhybridisierung angewandt, die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) (Amann *et al.* 1995, Wagner *et al.* 1995, Assmus *et al.* 1995, Murrell *et al.* 1998). Bei diesem Nachweis werden Oligonukleotidsonden verwendet, an die ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist. Unter optimierten Bedingungen lagern sich diese Sonden an die 16S rRNA der gewünschten Bakteriengruppe an (hybridisieren). Zellen, die eine ausreichende Menge Sonden gebunden haben, fluoreszieren und können mikroskopisch detektiert werden. Da die Bindung der Sonden an die 16S rRNA im intakten Ribosom erfolgt, wird bei einer erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung im allgemeinen vom Vorliegen vegetativer Zellen ausgegangen.

Da mit dieser Methode die Möglichkeit besteht, gruppenspezifische Detektionen durchzuführen, sollte für die Methan oxidierenden Bakterien ein System entwickelt werden, mit dem zwischen Typ I ( $\gamma$ -Proteobakterien) und Typ II ( $\alpha$ -Proteobakterien) Stämmen differenziert werden kann. Da für Methanotrophe bisher keine familienspezifischen 16S rRNA Sonden vorlagen, wurden mit Hilfe der ARB-



Software (Strunk und Ludwig 1996) verschiedene Sonden entworfen. Die genaue Vorgehensweise ist im Anhang in „Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation“ dargestellt.

In Tabelle 3.5 sind die verwendeten Sonden anderer Autoren (3.5a) sowie die neuen Sonden (3.5b) zusammengefasst. Die in Tabelle 3.5b angegebene Sonde M $\alpha$ 450 wurde mit Sequenzen der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank verglichen und zeigte unter anderem keine Fehlpaarungen zu Sequenzen der Stämme *Methylosinus trichosporium* (M29024), *Methylosinus sporium* (M95665), *Methylosinus* sp. (M95663 and M95664), "*Methylocystis minimus*" (L20844), *Methylocystis echinoides* (L20848), *Methylocystis parvus* (Y18945 and AF150805), "*Methylosporovibrio methanica*" (M29025). In Klammern angegeben sind die Registrierungsnummern (Accession No.) der zugehörigen Sequenzen bei EMBL. Damit deckt diese Sonde theoretisch die gesamten Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* ab.

**Tabelle 3.5a: Publierte Oligonukleotidsonden für den Nachweis Methylo-tropher und Methan oxidierender Bakterien mit FISH, die in dieser Arbeit verwendet wurden**

Sonde	Zielorganismen	Zielbereich <sup>3)</sup>	Sequenz
10 $\gamma$ <sup>1)</sup>	RuMP-Weg <sup>4)</sup> Methylotrophe, inkl. Typ I MOB <sup>5)</sup>	197-216	Sonde: 3'-TTCGCCCCCTAGAAGCCTGG-5' 16S rRNA: 5'-AAGCGGGGGAUCUUCGGACC-3'
MG-64 <sup>2)</sup>	Typ I MOB	64-84	Sonde: 3'-CTTGCCATTRTCCGGAAGCC-5' 16S rRNA: 5'-GAACGGUAAAYAGGCCUUCGG-3'
9 $\alpha$ <sup>1)</sup>	Serin-Weg <sup>6)</sup> Methylotrophe, inkl. Typ II MOB	142-159	Sonde: 3'-CAAGCCTTATTGAGTCCC-5' 16S rRNA: 5'-GUUCGGAAUAACUCAGGG-3'
MA-621 <sup>2)</sup>	Typ II MOB	621-641	Sonde: 3'-TTGGAGCCTTGACGGAAACT-5' 16S rRNA: 5'-AACCUCGGAACUGCCUUUGA-3'

<sup>1)</sup> Sonde nach Tsien *et al.* 1990, <sup>2)</sup> Sonde nach Bourne *et al.* 2000 <sup>3)</sup> Position nach *E. coli*-Numerierung (Brosius *et al.* 1978), <sup>4)</sup> Methylotrophe, die den Ribulose-Monophosphat-Weg zur Kohlenstofffixierung nutzen, <sup>5)</sup> MOB = Methan oxidierende Bakterien, <sup>6)</sup> Methylotrophe, die den Serin-Weg zur Kohlenstoffassimilation nutzen

**Tabelle 3.5b: Neu entworfene, familienspezifische Oligonukleotidsonden für Typ I und Typ II Methanotrophe sowie die in FISH verwendeten nicht-methanotrophen Referenzorganismen**

Sonde	Zielorganismen	Zielbereich <sup>1)</sup>	Referenzorganismus in FISH <sup>2)</sup>	Sonden- und Zielsequenz
Mα450	Typ II MOB	450-470	<i>Caulobacter crescentus</i> (2)	Sonde: 3'-CTATTACTGCCATGGACCTA-5' 16S rRNA: 5'-GAUAAUGACGGUACCUGGAU-3'
Mα464	Typ II MOB	464-484	<i>Caulobacter crescentus</i> (2)	Sonde: 3'-ATTACTGCCATGGACCTATT-5' 16S rRNA: 5'-UAAUGACGGUACCUGGAUAA-3'
My84	Typ I MOB	84-103	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2)	Sonde: 3'-AGCCCGCGACTGCTCACC-5' 16S rRNA: 5'-UCGGGCGCUGACGAGUGG-3'
My705	Typ I MOB	705-724	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2)	Sonde: 3'-CTAGAGTTCCTTGTGGTC-5' 16S rRNA: 5'-GAUCUGAAGGAACACCAG-3'
My669	<i>Methylobacter, Methylomonas</i>	669-690	<i>Methylomicrobium album</i> (1), <i>Methylococcus capsulatus</i> (1)	Sonde: 3'-CTCACCTTAAAGTCCACATCG-5' 16S rRNA: 5'-GAGUGGAAUUUCAGGUGUAGC-3'
My1004	<i>Methylo-microbium</i>	1004-1022	<i>Methylobacter luteus</i> (4) <i>Methylococcus capsulatus</i> (>4)	Sonde: 3'-TTAGACACTCTCTAGCAT-5' 16S rRNA: 5'-AAUCUGUGAGAGAUUGUA-3'
My983	Typ I MOB	983-1001	n.b.	Sonde: 3'-TGGATGGGAACTGTAGGT-5' 16S rRNA: 5'-ACCUACCCUUGACAUCCA-3'
My993	Typ I MOB	993-1011	n.b.	Sonde: 3'-CTGTAGGTCTCTTAGACA-5' 16S rRNA: 5'-GACAUCCAGAGAAUCUGU-3'

<sup>1)</sup> Position nach *E. coli* Numerierung (Brosius *et al.* 1978); <sup>2)</sup> Zahlen in Klammern geben die Anzahl Fehlpaarungen des Stammes zur Sondensequenz an

Für die Typ I spezifische Sonde My84 ergab ein Vergleich mit der EMBL-Datenbank Übereinstimmung mit den Sequenzen der Stämme *Methylobacter whittenburyi* (X72773), *Methylobacter luteus* (M95657), "*Methylobacter vinelandii*" (L20841), "*Methylobacter bovis*" (L20839), "*Methylomonas lutea*" (X72772),

*Methylobacterium album* (X72777), *Methylobacterium agile* (X72767), *Methylobacterium fodinarum* (X72778), *Methylobacterium aurantiaca* (X72776), "*Methylobacter capsulatus*" (L20843), *Methylococcus capsulatus* (X72770 und X72771) und *Methylococcus* sp. (X72769). Ein nicht-methanotropher Stamm mit Sequenzidentität zur Sonde war *Ectothiorhodospira shaposhnik* (M59151). Die Sonde My705 war zu weiteren Sequenzen von Typ I Methanotrophen identisch: *Methylobacterium pelagicum* (X72775), *Methylobacterium methanica* (L20840 und AF150806), *Methylobacterium* sp. (L20846), "*Methylobacterium rubra*" (M95662), *Methylobacterium fodinarum* (X72778), *Methylobacterium aurantiaca* (X72776), *Methylococcus capsulatus* (X72770 und X72771), *Methylococcus* sp. (X72769), *Methylosphaera hansonii* (U77533 und U67929), sowie zu zwei symbiontischen, bisher nicht isolierten Methanotrophe ((U29164 und U05595). Diese beiden Typ I Sonden zusammen genommen zeigten demnach zu einem Grossteil der Typ I Gattungen Sequenzidentität.

Die Sonden wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen FLUOS, Texas Red oder CY5 versehen. Alle Sonden wurden in TE-Puffer (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) auf eine Konzentration von 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  verdünnt und bis zur Anwendung aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.4.7.1. Fixierung der Reinkulturen und Umweltproben

Die nach der Sequenzhomologie (ARB) ausgewählten Sonden zeigten Sequenzidentität zu möglichst vielen Vertretern der Typ I oder II Methanotrophen, bei gleichzeitiger möglichst grosser nicht-Übereinstimmung mit Sequenzen anderer Bakteriengruppen. Diese Sonden wurden an Kulturen methanotropher und nicht-methanotropher Referenzbakterien auf ihre Eignung für die *in-situ* Hybridisierung getestet. Ein spezifischer Nachweis der Methanotrophen ist nur möglich, wenn diese Referenzorganismen in der Hybridisierung kein Signal ergeben.

Die Fixierung und Hybridisierung wurde nach einem Protokoll von Assmus *et al.* (1995) durchgeführt. Kulturen von *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128), *Methylobacter luteus* (NCIMB 11914), *Methylococcus capsulatus* (NCIMB 11853) und *Methylobacterium album* (NCIMB 11123), sowie die Typ II Stämme *Methylosinus sporium* (NCIMB 11126), *Methylosinus trichosporium* (NCIMB

11131), und *Methylocystis parvus* (NCIMB 11129) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase beprobt und fixiert. Dazu wurden 1,5 ml der Kulturen für 5 min bei 13000 x g abzentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Sepatech) und das Pellet in 100 µl physiologischer Kochsalzlösung (PBS = NaCl 8 g l<sup>-1</sup>, KCl 0,2 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g l<sup>-1</sup>, pH 7,0) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 300 µl einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) pipettiert, gemischt und für mindestens 45 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschliessend wurden die Zellen bei 13000 x g für 5 min abzentrifugiert und das Pellet 5 x mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet in reinem Ethanol und PBS zu gleichen Teilen (v/v) aufgenommen und bei -20 °C bis zur Hybridisierung gelagert.

Von Umweltproben wurden 1 - 2 ml Suspension für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 400 µl 4 %-igem Paraformaldehydlösung rückgelöst und die Proben mindestens 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden wie für Reinkulturen angegeben durchgeführt.

#### 3.4.7.2. Ganzzell Hybridisierung

Für die Hybridisierungen wurden Objekträger mit 8 Vertiefungen (Durchmesser 6 mm) in einer hydrophoben Teflonbeschichtung verwendet. Die zu hybridisierenden Proben wurden in diesen Vertiefungen aufgetrocknet.

Von den Suspensionen der fixierten Zellen wurden 1 - 2 µl pro Vertiefung auf Objekträger aufgetropft und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Wegen der geringen Zellzahlen in Umweltproben wurde das aufgetropfte Volumen auf 40 µl für Boden- und 20 µl für Wurzelproben erhöht. Zur Verringerung der **Autofluoreszenz** in Umweltproben wurden die aufgetrockneten Suspensionen 30 min mit 0,01 % Toluidinblau ((w/v) in PBS, pH 7,0) überschichtet. Toluidin Blau wurde von verschiedenen Autoren zur Verringerung der Autofluoreszenz in Pflanzengewebe verwendet (Smith und McCully 1978, Shishkoff 1989, Lulai und Morgan 1992, Graham und Joshi 1996, van der Geest und Petolino 1998). Die Färbelösung wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Anschliessend wurden die Zellen durch Eintauchen in 50, 80 und 100 % Ethanol für je 3 min gewaschen. Nach kurzem Lufttrocknen wurden pro Vertiefung des Objekträgers 8 µl Hybridisierungslösung (Tris (Tris-hydroxylethylaminomethane) 2,4 g l<sup>-1</sup>, SDS

(Natriumdodecylsulfat) 2,0 g l<sup>-1</sup>, EDTA 2,0 g l<sup>-1</sup>, 0,9 M NaCl, Formamid je nach Bedarf, pH 7,4) und 1 µl der entsprechenden Sonde (50 ng µl<sup>-1</sup>) aufgetragen. Die Stringenz der Hybridisierung wurde durch Zugabe von Formamid (Sigma) in den Hybridisierungspuffer eingestellt. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 46 °C im Hybridisierungsofen (Hybaid, MWG-Biotech) über 1,5 h für Kulturen bzw. 2 bis 2,5 h für Umweltproben.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger mit Waschpuffer (48 °C, Tris 2,4 g l<sup>-1</sup>, SDS 2,0 g l<sup>-1</sup>, EDTA 2,0 g l<sup>-1</sup>, 0,9 M NaCl bei 0 % Formamid, pH 7,4) abgespült und zusätzlich für 20 min bei 48 °C mit 8 µl Waschpuffer pro Vertiefung inkubiert. Nach erneutem Abspülen wurden die Objektträger luftgetrocknet. Die im Waschpuffer enthaltene Menge an NaCl wurde entsprechend der im Hybridisierungspuffer eingesetzten Menge Formamid gewählt. Die erforderliche Zugabe von NaCl-Stammlösung (4,5 M) zu 40 ml Waschlösung je nach verwendeter Formamidmenge ist in Tabelle 3.6 angegeben.

**Tabelle 3.6: Zur Einstellung der Stringenz des Waschpuffers nötige Zugabe von 4,5 M NaCl-Lösung bei verschiedenen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer.** Aus Assmus (1995)

% Formamid im Hybridisierungspuffer	Zugabe von NaCl in Waschpuffer	% Formamid im Hybridisierungspuffer	Zugabe von NaCl in Waschpuffer
0 %	10,0 ml	20 %	2,0 ml
5 %	7,0 ml	25 %	1,4 ml
10 %	4,5 ml	30 %	0,9 ml
15 %	3,0 ml	35 %	0,5 ml

Zur Kontrolle der Hybridisierung und zur Färbung nicht aktiver Zellen wurden alle Proben mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) für 15 min gegengefärbt. Das DAPI-Salz wurde in destilliertem Wasser zu einer Stammlösung von 2,4 mg in 50 ml gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert. Vor der Färbung wurde daraus eine 1:500 verdünnte Arbeitslösung mit 0,2 µm-filtriertem destilliertem Wasser angesetzt. Die Färbelösung wurde mit destilliertem Wasser abgespült und die Objektträger im Dunkeln luftgetrocknet. Das Deckglas wurde mit 2-3 µl Antifading (Citifluor auf Glycerinbasis, Molecular Probes) pro Vertiefung des

Objektträgers montiert. Die Präparate konnten nach 5 - 10 min Einwirkungszeit mikroskopiert werden.

Die mikroskopische Betrachtung erfolgte an einem Confocal-Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) der Firma Leica (DMR XE, Typ TCS NT) mit einem für Ölimersion geeigneten Objektiv (63x1,32-0,6). Für die Bildbearbeitung wurde eine Software der Firma Leica (TCS NT, Version 1.5.451) verwendet.

Die Auszählung der in Umweltproben enthaltenen Methanotrophen erfolgte nach gleichzeitiger Hybridisierung mit der universellen Eubakteriensonde (Eub338), der Typ I Sondenkombination (M $\gamma$ 85 + 704) und der Typ II Sonde (M $\alpha$ 450) mit nachträglicher DAPI-Färbung. Die Anzahl der detektierten Eubakterien und Methanotrophen wurde relativ zur Gesamtzahl detektierter Zellen (DAPI) angegeben.

#### **3.4.8. Molekularbiologische Methoden**

Zur näheren Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft und ihrer Entwicklung im Reis-System wurde aus Proben der verschiedenen Kompartimente und verschieden alter Pflanzen DNA extrahiert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte ähnlich der bei Henckel *et al.* (1999) angegebenen Methoden.

##### **3.4.8.1. DNA-Extraktion aus Wurzel- und Bodenproben**

Für die DNA-Extraktion wurden 5 ml der Rhizoplane- und Homogenisatproben bzw. je 2 ml der Bodensuspensionen in 2 ml Schraubdeckelröhrchen pelletiert (13000 x g, 5 - 10 min, Biofuge 13, Heraeus Sepatec). Der Überstand der Proben wurde verworfen.

Zum Pellet wurden 800  $\mu$ l eines 120 mM Natriumphosphat-Puffers (pH 8) und 260  $\mu$ l SDS-Lösung (10 % SDS, 0,5 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, pH 8,0) pipettiert und das Restvolumen mit autoklavierten Zirkonium-Silicium-Kugeln (Durchmesser 0,1 mm, BioSpec Products Inc.) aufgefüllt. Nach Rücklösen des Pellets erfolgte der Zellaufschluss im Bead-Beater (FP 120, FastPrep, Savant Instruments Inc.) für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m s<sup>-1</sup>.

Nach Abzentrifugieren (13000 x g, 4 min) wurde der Überstand abpipettiert und die Probe mit 700  $\mu$ l Natriumphosphat-Puffer reextrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und zur Fällung von Proteinen und Zellbestandteilen mit 4 °C kaltem Ammoniumacetat (7,5 M) im Verhältnis 2:5 (v/v) versetzt und für 5 - 10 min auf Eis

inkubiert.

Nach erneutem Abzentrifugieren ( $13000 \times g$ , 4 min) wurde der Überstand entnommen und zur Fällung der Nukleinsäuren mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol (100 %, Raumtemperatur) versetzt. Anschliessend wurden die Ansätze für mindestens 60 min bei 4 °C und  $\sim 20000 \times g$  (14000 Upm, Eppendorf Zentrifuge 5417 R) zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, erneut für 5 min abzentrifugiert ( $20000 \times g$ ) und anschliessend unter Vakuum getrocknet (DNA SpeedVac DNA 110, Savant). Das gereinigte Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Zeigten die Proben in einem 1 %-igen Agarose Gel eine ausreichende DNA-Menge, wurde eine zusätzliche Aufreinigung über Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) vorgenommen, um die DNA-Suspension von Huminsäuren zu reinigen.

#### **3.4.8.2. DNA-Aufreinigung über Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)**

Da DNA-Extrakte aus Bodenproben häufig Huminsäuren enthalten, die enzymatische Reaktionen stören, wurden die Extrakte bei ausreichenden DNA-Konzentrationen über PVPP (Holben *et al.* 1988, Berthelet 1996) aufgereinigt.

Dazu wurden 30 g PVPP (Sigma) mit 400 ml 5 N Salzsäure überschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Absetzen des PVPP wurde der Überstand abgegossen und das PVPP dreimal mit TE-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Nach Auffüllen auf das ursprüngliche Volumen mit TE-Puffer wurde der pH-Wert der Suspension mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt. Mit dieser Suspension wurden Micro Bio-Spin Säulchen (Bio-Rad) direkt vor Gebrauch befüllt. Dazu wurden die Säulchen in 2 ml Eppendorfcups gestellt, 1,5 – 2 ml der Suspension in die Säulchen pipettiert und bei  $375 \times g$  für 30 s abzentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis die Säulchen vollständig mit PVPP gefüllt waren. Erst kurz vor Zugabe des zu reinigenden DNA-Extraktes wurden die Säulchen bei  $375 \times g$  für 2 min trocken zentrifugiert. Anschliessend wurden die Säulchen in frische Cups gestellt, 100 µl DNA-Extrakt mittig aufpipettiert und 3 - 4 min bei Raumtemperatur einwirken lassen. Die Elution erfolgte bei  $375 \times g$  für 2 min. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde in 1:10 Verdünnungen in Wasser wie in Kapitel 3.4.8.3 dargestellt bestimmt. Zusätzlich wurde die Qualität der DNA in einem 1 %

Agarose-Gel überprüft.

#### 3.4.8.3. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (GeneQuant Spectrophotometer, Pharmacia). Dazu wurden die DNA-Lösungen in DNA- und RNA-freiem Wasser (PCR-Wasser, Braun) 1:10 oder 1:20 verdünnt. Die Absorption des Wassers wurde als Blindwert von der Absorption der Probe subtrahiert und die DNA-Konzentration der Ursprungslösung nach der folgenden Formel (Sambrook *et al.* 1989) berechnet:

$$c_{\text{DNA}} [\text{ng } \mu\text{l}^{-1}] = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Diese Formel gilt für die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNA, und setzt voraus, dass bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  eine optische Dichte von 1 erreicht wird.

#### 3.4.8.4. DNA-Amplifikation

Die Amplifikation der 16S rRNA-Gene und der  $\alpha$ -Untereinheit des Methanoldehydrogenase-Gens (*mxoF*) wurde unter den in Tabelle 3.7 aufgeführten Bedingungen durchgeführt (Henckel *et al.* 1999). Amplifikationen für nachfolgende DGGE-Analysen hatten ein Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  und enthielten 1 U *AmpliTaq* DNA-Polymerase (Perkin Elmer), 0,5  $\mu\text{M}$  pro Primer und 1  $\mu\text{l}$  Template (siehe unten). Die Amplifikation wurde in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf) ausgeführt.

Die über PVPP aufgereinigten DNA-Extrakte wurden in Konzentrationen von 2 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  (in TE-Puffer) als Template eingesetzt. Bei nicht über PVPP aufgereinigten DNA-Extrakten war eine spektrophotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung nicht möglich, da Huminsäuren bei dieser Messung den Absorptionswert verfälschen. Die nicht behandelten Extrakte der Wurzelsuspensionen wurden daher in Verdünnungen von 1:10, 1:50 und 1:100 (TE-Puffer) in PCR-Amplifikationen mit dem universellen Primerset auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft und für weitere PCRs die Verdünnung mit dem besten Amplifikationsresultat – im allgemeinen die 1:10 Verdünnung - eingesetzt.



**Tabelle 3.7: Zur DNA-Amplifikation verwendete Primersets und PCR-Bedingungen**

Primerset <sup>1)</sup>	Zielgen	Temperatur in PCR	Anzahl Zyklen	Reaktionspuffer
Universell 533f / 907r-GC	16S rRNA	60-50°C	20 x -0,5°C plus 10 x 50°C 30 s	1,5 mM MgCl <sub>2</sub> + dNTPs 0,1 mM
9α, 142f / 533r-GC	16S rRNA	60°C	30 × 30 s	Premix F
10γ, 197f / 533r-GC	16S rRNA	60°C	30 × 30 s	Premix F
mxαF 1003f / 1562r-GC	α-Untereinheit der Methanol- dehydrogenase	55°C	30 × 1 min	Premix E

<sup>1)</sup> GC-Klammern Primer 907r und 533r: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCGC CCC CGC CCC, GC-Klammer Primer 1567r: CCC CCC CCC CCC CGC CCC CCG CCC CCC GCC CCC GCC GCC C

Zur Reamplifikation von DGGE-Banden wurden je nach Bandenstärke 0,2 – 1 µl Template und 1U *AmpliTaq* DNA-Polymerase pro 100 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in 3 %-igen Agarose-Gelen aufgetrennt und auf ihre Spezifität überprüft. Die Konzentrationen von Template und DNA-Polymerase im Amplifikationsansatz sowie die Zahl der Zyklen wurden solange variiert, bis ein spezifisches PCR-Produkt erhalten wurde. Reamplifikationen von 9α- und 10γ-Banden wurden statt mit Premix F mit dem weniger Magnesium enthaltenden Premix E (MasterAmp 2xPCR PreMixes, Biozym) als Reaktionspuffer durchgeführt.

#### 3.4.8.5. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die PCR-Produkte wurden mit einem DGene-System (BioRad) in 1 mm dicken Polyacrylamid-Gelen (6,5% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid [37,5:1], BioRad) aufgetrennt. Zur Stabilisierung der Gele wurden PAG-Gelbond Folien (FMC Bioproducts) verwendet. Die für die Herstellung der Gele verwendeten Lösungen sind im folgenden Abschnitt zusammengestellt.

Die Stammlösung ohne denaturierende Agenzien (0%) enthielt 6,5 % Acrylamid und 0,5-fach konzentrierten Tris-Acetate-EDTA (TAE) Puffer, entsprechend 81 ml Acrylamidlösung und 25 ml 10 × TAE in 500 ml Gesamtvolumen. Die 80 %- "Denaturanz" Stammlösung enthielt 6,5 % Acrylamid, 0,5 × TAE, 5,6 M Harnstoff (168 g in 500 ml) und 32 % Formamid (160 ml in 500 ml). Der 10 × TAE-Puffer enthielt 0,8 M Tris Base, 0,4 M Natriumacetat und 0,02 M EDTA. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Für die PCR-Produkte der Primersets universell, mxaF und 10γ wurden Gradienten von 35 bis 70 % Denaturanz, für die 9α-Produkte 40 bis 70 % verwendet. Die PCR-Produkte der verschiedenen Reaktionen wurden je nach Bandenstärke im 3 % Agarose-Gel vollständig oder in Teilvolumina auf die DGGE-Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 60 °C und 150 V für 5 h in Protean Xi II-Laufkammern (BioRad). Die Gele wurden mit SYBR-Green I (Biozym, 1 : 10 000 in Wasser (PCR-rein, Braun) verdünnt) für mindestens 30 min gefärbt und am Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) ausgewertet.

Der zur Färbung der DNA verwendete SYBR-Green Farbstoff fluoresziert auch ausserhalb des Wellenlängenbereichs von UV-Licht. Dadurch konnten die Banden ohne Schädigung der DNA auf einem Durchlichtgerät (Darkreader, Clare Chemical Research) sichtbar gemacht und ausgewählte Banden mit sterilen, abgeschnittenen 200 µl Pipettenspitzen ausgestochen werden. Diese Banden wurden in 200 µl PCR-Wasser suspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.8.6. Klonierung von DGGE-Banden der 9α-Amplifikationsprodukte**

Bei der Reamplifikation von DGGE-Banden, die nach Amplifikation mit dem 9α-Primerset erhalten wurden, kam es zur Bildung unspezifischer Nebenprodukte. Diese wurden als Nebenbanden im 3 % Agarose Gel sichtbar. Diese Nebenbanden konnten auch durch Variationen der Templatemenge, der Zyklenzahl und/oder der Polymerase Konzentration nicht entfernt werden. Um eine Sequenzierung zu ermöglichen, wurden die Reamplifikationsprodukte, die in der DGGE die erwartete Bande ergaben, nach Aufreinigung über QIAquick Säulchen (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) und Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 3.4.8.3) kloniert.

Die Klonierung erfolgte nach den Herstellerangaben mit Hilfe eines Klonierungskits (pGEM-T Vector System II, Promega), in dem vorgefertigte Klonierungsvektoren (pGEM-T), kompetente Zellen (*E. coli* JM 109), T4 DNA Ligase und Ligationspuffer enthalten waren. Die einzusetzende DNA-Menge wurde für ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 zu 20 ng berechnet und entsprechende Mengen der aufgereinigten PCR-Produkte in der Ligation eingesetzt. Die Ligation erfolgte über 12 – 24 h bei 4 °C. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal Agarplatten (Invitrogen Fertigmedium, 10 g l<sup>-1</sup> Bacto-Trypton, 5 g l<sup>-1</sup> Bacto-Hefeextrakt, 5 g l<sup>-1</sup> NaCl, 15 g l<sup>-1</sup> Agar, pH 7,0 mit NaOH, versetzt mit 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin) ausgestrichen. Dazu wurde der LB-Ampicillin Agar nach Erkalten mit 100 µl IPTG (100 mM) und 25 µl X-Gal-Lösung (10 mg X-Gal in 200 µl N,N'-Dimethylformamid) pro Platte versetzt. Dieser Agar ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Klonen mit Insert (weisse Kolonien) und Klonen ohne Insert (blaue Kolonien) (Rotthauwe *et al.* 1997). Zwanzig zufällig ausgewählte weisse Kolonien pro Transformationsansatz wurden auf LB-Ampicillin Agar subkultiviert, um die Zellmasse zu erhöhen. Anschliessend wurden die Kolonien in je 100 µl PCR-Wasser suspendiert, für 10 min bei 100 °C gekocht und nach Abkühlen auf Eis abzentrifugiert (5 min, ~ 20000 x g, 4 °C). Der so erhaltene Überstand wurde als PCR-Template verwendet. Die Klon-DNA wurde mit dem 9α-Primerset amplifiziert, um Klone mit dem richtigen Insert zu identifizieren. Diese Amplifikationen resultierten wie die direkten Reamplifikationen der DGGE-Banden in Doppelbanden im Agarose-Gel, so dass die Möglichkeit der direkten Sequenzierung von Reamplifikationsprodukten parallel zur Sequenzierung der Klonierungsprodukte getestet wurde. Die Sequenzierungen waren mit beiden Methoden möglich und ergaben mit und ohne Klonierung für eine Bande das gleiche Ergebnis.

#### **3.4.8.7. Sequenzierung von DGGE-Banden und Reinkulturen der Methan oxidierenden Bakterien**

Die Reamplifikation der DGGE-Banden wurde wie in Kapitel 3.4.8.4 dargestellt durchgeführt. Die Reamplifikationsprodukte wurden erneut über DGGE aufgetrennt und die Reinheit und Laufhöhe der Banden überprüft. Ergab sich für das Reamplifikationsprodukt nur eine Bande in der erwarteten Laufhöhe, wurde es wie

für die Reinkulturen unten dargestellt für die Sequenzierung aufgereinigt oder zur Auftragssequenzierung abgegeben (MWG-Biotech).

Für die Teilsequenzierung der Reinkulturen wurde ihre DNA wie für die Umweltproben dargestellt extrahiert (Kapitel 3.4.8.1) und auf  $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  in TE-Puffer verdünnt. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern 9/27 vorwärts und 1492/1512 rückwärts (Lane 1991). Zur Abtrennung von Nucleotiden, Primern, Salzen und DNA-Polymerase wurden QIAquick Säulchen (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) verwendet. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch in 1:20 Verdünnungen in Wasser bestimmt (Kapitel 3.4.8.3).

Für die Sequenzierreaktion nach der Kettenabbruchmethode wurde eine vorgefertigte Mischung aus desoxy-Nucleotiden und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten didesoxy-Nucleotiden verwendet (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer). Die Sequenzierreaktion wurde entsprechend der Herstellerangaben mit etwa  $60 \text{ } \mu\text{g}$  Template-DNA und  $3,2 \text{ pmol}$  des entsprechenden Primers angesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach 3 min Denaturierung bei  $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  über 25 Zyklen der Sequenz:  $96 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 s,  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 s,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 min und wurde mit einer Kühlung auf  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  abgeschlossen. Die Heizrate des verwendeten Gerätes (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) beträgt  $1 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . In diesen Reaktionen wurden die entsprechenden Primer der ursprünglichen PCR-Reaktion, aber ohne GC-Klammer verwendet. Das Produkt der Sequenzierreaktion wurde über Sephadex Säulchen (AutoSeq G-50, Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt, in einer Vakuumzentrifuge (DNA SpeedVac DNA 110, Savant) eingetrocknet und bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für den Sequenzierlauf wurde das DNA-Pellet in  $3 \text{ } \mu\text{l}$  Ladepuffer („Formamid Loading Dye“ für fluoreszierende Proben, Amersham Pharmacia Biotech) aufgenommen, 3 min bei  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und direkt anschliessend auf ein 5 %-iges Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetragen. Die Trennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte in einem automatischen Sequenziergerät (373A DNA Sequencer, Perkin Elmer Applied Biosystems) über 16 h bei 150 V.

#### **3.4.8.8. Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung**

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms DNA-Star (Lasergene) bearbeitet. Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen der Amplifikationen mit

verschiedenen Primerpaaren wurden in die ARB-Software (Strunk und Ludwig 1996) importiert und im Vergleich zu den 20 nächstverwandten Sequenzen der Datenbank aligned (FastAligner, ARB). Die Einordnung der Sequenzen in einen 16S rRNA Stammbaum erfolgte zunächst über die Maximum Parsimony Methode. Anschliessend wurden Vollsequenzen der den Teilsequenzen ähnlichsten Organismen ausgewählt und mit diesen ein Stammbaum nach der Neighbour-Joining Methode berechnet. In diesen Stammbaum wurden die Teilsequenzen anschliessend unter Erhaltung der Stammbaumtopologie eingerechnet.

Zusätzlich zur Analyse im ARB wurden die Sequenzen mit in der EMBL-Genbank enthaltenen Sequenzen verglichen (BLAST Search). Die hier erhaltenen Sequenzen mit der grössten Ähnlichkeit wurden – soweit noch nicht enthalten – in die ARB-Datenbank eingerechnet und bei der Berechnung der Stammbäume nach dem Neighbour-Joining Verfahren berücksichtigt.

Die Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit des Methanol-Dehydrogenase Gens wurden von Hand mit Sequenzen dieses Gens aus der EMBL-Datenbank aligned. Die so bearbeiteten Nukleotidsequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit diesen die Stammbäume berechnet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Versuche mit Kulturen methanotropher Bakterien**

Zur Entwicklung einer Methode zum spezifischen Nachweis der Zellaktivität von Methanotrophen wurden zunächst Versuche mit Reinkulturen Methan oxidierender Bakterien durchgeführt.

#### **4.1.1. Vitalfarbstoffscreening und Färbungen mit CTC**

Die Aktivität einzelner Zellen kann mit Hilfe von Kultivierungen nicht nachgewiesen werden, da einerseits nicht alle lebensfähigen Zellen kultivierbar sind und andererseits auch nicht aktive Zellformen, wie Ruhestadien, unter Kultivierungsbedingungen wieder in vegetative Zellen umgewandelt werden. Eine Methode zum Nachweis der aktuellen Zellaktivität ist die Färbung mit Vitalfarbstoffen. Diese Methode beruht auf der Umsetzung von Farbstoffvorläufermolekülen durch Stoffwechselfunktionen der Zelle in Farbstoffmoleküle, die sich in der Zelle oder im Medium anreichern. Die mit dem Farbstoff markierten Zellen können z.B. mikroskopisch detektiert und ausgezählt werden. Die relative Anzahl der markierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen gibt Aufschluss über den Aktivitätszustand einer Kultur.

In den Versuchen zur Auswahl des am besten für Methanotrophe geeigneten Vitalfarbstoffs wurde mit dem Tetrazolium-Farbstoff CTC, der in der Atmungskette umgesetzt wird, die deutlichste Färbung der Methanotrophen erreicht. Dieser Farbstoff hatte zudem den Vorteil eines fluoreszierenden Stoffwechselprodukts (CTF, rot), das eine mikroskopische Detektion mit Auflichtfluoreszenz sowie eine problemlose Gegenfärbung mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI ermöglichte. Mit den verschiedenen anderen Vitalfarbstoffen konnte nur ein geringer Prozentsatz der Zellen angefärbt werden. Die Färbung mit TTC und Neoblue-Tetrazolium führte zur Bildung extrazellulärer Farbstoffkristalle, während Neo-Tetrazoliumchlorid nicht umgesetzt wurde. Bei Verwendung des nicht-fluoreszierenden Farbstoffes INT traten Probleme beim mikroskopischen Nachweis der gefärbten Zellen auf, da diese im Hellfeld kaum zu erkennen und somit eine Auszählung nach Auffiltrieren auf Cellulose-Nitrat-Membranen nicht möglich war. INT

ist zudem in Immersionsöl löslich, so dass die Montage der Filtermembranen auf den Objekträgern bereits zu einer Auflösung der intrazellulären Farbstoffkristalle führte. Auswertungen von Feuchtpräparaten zeigten im direkten Vergleich der Anzahl gefärbter Zellen mit der im Phasenkontrast sichtbaren Zellzahl, dass die INT-Färbung nicht quantitativ war.

Weiterführende Versuche wurden daher nur mit dem Farbstoff CTC durchgeführt. Dazu wurden Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase vergleichend vor der Färbung abzentrifugiert bzw. direkt in ihrem Wachstumsmedium zur Färbung eingesetzt. Parallel hierzu wurden zwei verschiedene Ansatzvolumina getestet. Beide Parameter, Zentrifugation und Ansatzgröße, hatten keine Auswirkungen auf das Färbeergebnis. In Phasenkontrastuntersuchungen der CTC-gefärbten Ansätze wurde allerdings deutlich, dass die Farbstoffkristalle sich - entgegen der Theorie - im allgemeinen nicht in den Zellen anreicherten, sondern aussen an die Zellen angelagert vorlagen. Diese Beobachtung traf sowohl für die positiven Kontrollansätze mit *Escherichia coli* als auch für die Methanotrophen zu. Dadurch konnte auch keine parallele DAPI- und CTC-Färbung in auffiltrierte Präparaten gezeigt werden. Zudem erfolgte die Färbung der Methanotrophen auch bei Verwendung von Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase nicht quantitativ.

In Versuchen zur Stoffwechselaktivität verschiedener Methan oxidierender Bakterien fanden auch Roslev und King (1994), dass verschiedene Vitalfarbstoffe bei Verwendung für Methanotrophe nicht zu quantitativen Färbungen der Zellen führten. Sowohl im natürlichen Habitat als auch während unterschiedlicher Hungerzustände in Reinkulturen ist eine deutlich geringere Aktivität der einzelnen Zellen zu erwarten als in der exponentiellen Wachstumsphase. Da aber schon die hochaktiven Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase in den Färbeansätzen nicht quantitativ angefärbt wurden, ist diese Methode der Vitalfärbung auch für die geplante Anwendung *in-situ* nicht geeignet.

Um einzelne Zellen der Methanotrophen spezifisch *in-situ* nachweisen zu können, wurden von Gilbert *et al.* (1998) polyklonale Antikörper verwendet. Für ihre Herstellung ist die Verwendung von Reinkulturen der „Zielbakterien“ notwendig.

#### **4.1.2. Untersuchungen an Reinkulturen Methan oxidierender Bakterien**

In mikroskopischen Untersuchungen von Präparaten aus Kulturen Methan oxidie-

render Bakterien wurden ungewöhnliche Zellformen detektiert. Diese Beobachtungen führten zu Zweifeln an der Reinheit der Kulturen und zu genaueren Untersuchungen zu diesem Thema, die in den folgenden Abschnitten dargestellt sind.

#### **4.1.2.1. Zell- und Koloniemorphologie in Kulturen methanotropher Bakterien**

Eine Reinkultur ist definiert als Kultur von Zellen, die sowohl stoffwechselphysiologisch als auch morphologisch einheitlich sind. Sie sollte sowohl durch eine typische Zell- als auch eine typische Koloniemorphologie charakterisiert sein. Es sind zwar Arten mit verschiedenen Zellformen in einer Reinkultur bekannt (Pleomorphie), diese treten aber nur unter charakteristischen Bedingungen auf.

Zur Überprüfung der Methanotrophen wurden die Kriterien Zell- und Koloniemorphologie sowie eine weitere charakteristische Eigenschaft genutzt: Das Wachstum mit Methan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, bei gleichzeitiger Unterdrückung des Wachstums durch hohe Konzentrationen organischer Verbindungen im Kultivierungsmedium (Hanson *et al.* 1992).

Die verschiedenen Stämme Methan oxidierender Bakterien aus der institutseigenen Stammsammlung sowie aus offiziellen Stammsammlungen (Kapitel 3.1.1) wurden parallel auf Mineralsalzmedien (unter Zugabe von Methan) und auf nährstoffreichen Medien (ohne Methan) kultiviert. Nach mehrwöchiger Inkubation zeigten alle untersuchten Stämme Wachstum auch auf Komplexmedium (Standard I Agar). Auf diesem war das Wachstum im Vergleich zu den Mineralsalzmedien zwar geringer, aber dennoch deutlich zu erkennen. Auch nach mehreren Subkultivierungen wuchsen die Kulturen auf nährstoffreichen Medien und erfüllten somit nicht die grundlegende Eigenschaft der Methanotrophen, durch hohe Konzentrationen organischer Verbindungen gehemmt zu werden.

Mikroskopische Untersuchungen der Kultivierungen sowohl auf Mineralsalz- als auch auf Komplexmedien ergaben, dass neben den für Methanotrophe typischen Zellformen auch ungewöhnliche Zellen vorhanden waren (Tabelle 4.1). Es wurden nicht alle angegebenen Zellformen parallel in einer Kultur detektiert, jedoch traten die "sehr kleinen Stäbchen" in allen Kulturen auf.

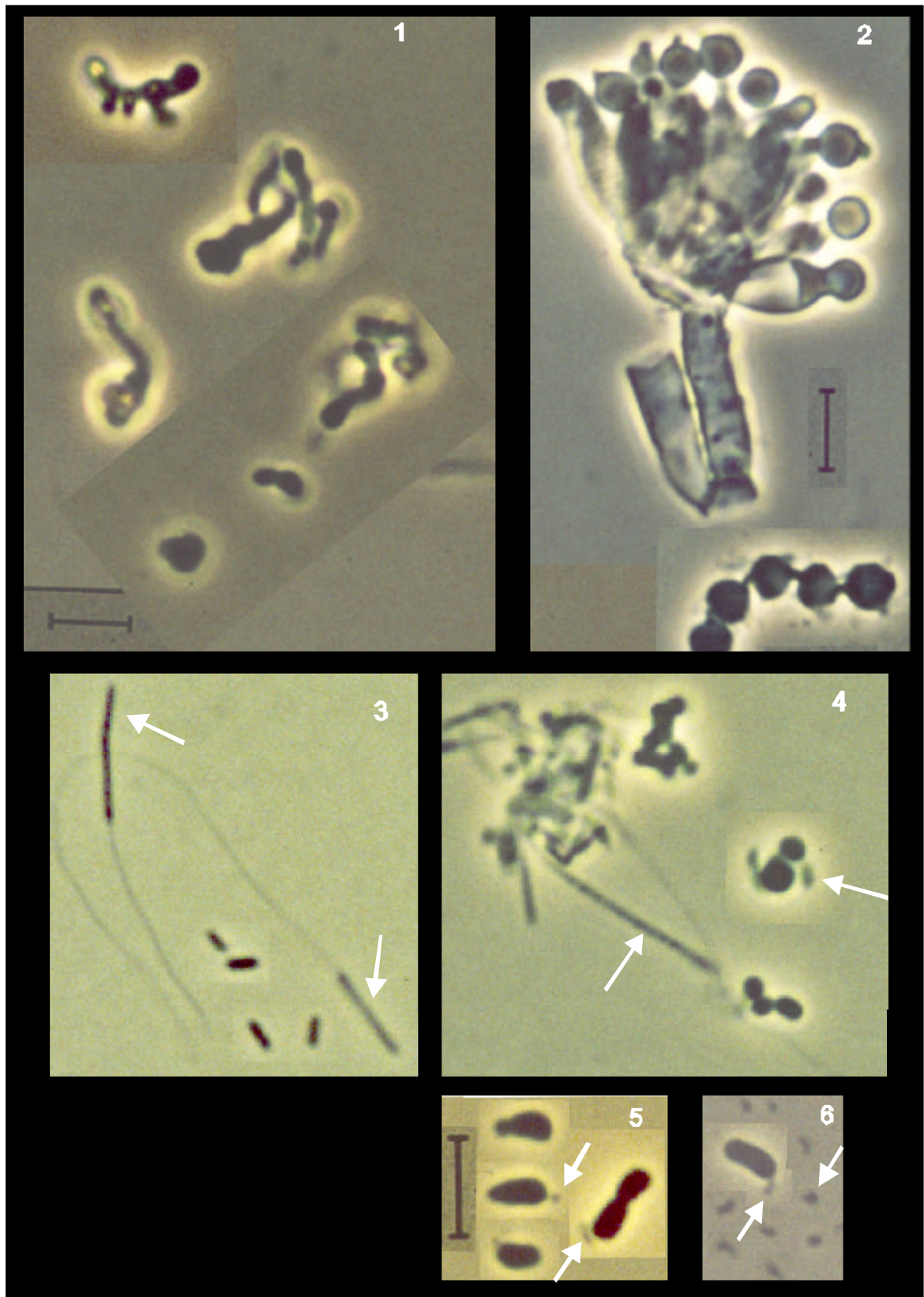


**Tabelle 4.1: Auflistung ungewöhnlicher Zelltypen, die in Kulturen der Methanoxidierenden Bakterien nachgewiesen wurden**

Zellmorphologie	Grösse
"sehr kleine Stäbchen", beweglich	ca. 0,2 - 0,5 x 0,5 – 1 µm
Stäbchen	1-2 x 3 µm
runde Zellen	Durchmesser ca. 2,5 µm
myzelartige Strukturen	
sehr dünne Stäbchen unterschiedlicher Länge	0,5 µm x 1,5 - 5 µm

Durch die Bildung von Dauerstadien wie Sporen und Cysten weisen auch Methanotrophe verschiedene Zellformen auf (Whittenbury *et al.* 1970a und b, Hanson *et al.* 1992, Hanson und Hanson 1996, Bowmann 1999), so dass eine eindeutige Entscheidung, ob es sich bei der ungewöhnlichen Zelle um einen Vertreter der Methanotrophen handelte oder nicht, schwerfiel. Zur Veranschaulichung der Verunreinigungen sind in Abbildung 4.1 mikroskopische Bilder der hier untersuchten Stammkulturen wiedergegeben.

Die als "sehr kleine Stäbchen" bezeichneten Zellformen erwiesen sich als die hartnäckigste Verunreinigung. Sie liessen sich mit unterschiedlichen Aufreinigungsverfahren nicht aus den Kulturen der Methanotrophen entfernen (siehe Kapitel 4.1.3). Mit Hilfe von DAPI-Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass die "sehr kleinen Stäbchen" DNA enthielten. In Ansätzen zur Vitalfärbung methanotropher Bakterien mit dem Farbstoff CTC wurden neben gefärbten Zellen der für Methanotrophe typischen Morphologie auch sehr kleine rot-fluoreszierende Punkte beobachtet. Dies wies auf eine Anfärbung der "sehr kleinen Stäbchen" mit CTC hin. Leider war eine Überprüfung dieser „Farbpunkte“ im Phasenkontrast nicht möglich, da die Detektion nach Auffiltrieren auf lichtundurchlässigen Membranen durchgeführt wurde, die nur für Auflichtmikroskopie geeignet sind. In Färbansätzen, die im Feuchtpräparat mikroskopiert wurden, konnten dagegen keine mit dem Vitalfarbstoff angefärbten "sehr kleinen Stäbchen" nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.1: Ungewöhnliche Zellformen in Kulturen Methanoxidierender Bakterien.** Zur besseren Illustration wurden Teile verschiedener Bilder gleicher Vergrößerung zusammengesetzt. Die Balken entsprechen 10 µm. Pfeile markieren ungewöhnliche Zelltypen.  
 1) Verzweigte Zellen in einer *Methylosinus sporium* Kultur (8 Tage/10 Standard I), 2) Fruchtkörper und Konidiosporen in einer Kultur des Isolats RP1 (16 Tage Standard I), 3) Grosse Stäbchen in einer *Methylobomonas methanica* Kultur (NMS), 4) Grosse Stäbchen in einer *Methylocystis parvus* Kultur (NMS), 5) "Sehr kleine Stäbchen" in einer *Methylosinus trichosporium* Kultur (NMS), 6) "Sehr kleine Stäbchen" in einer Kultur des Isolats Rp1 (NMS)

Zusätzlich zur Zellmorphologie wurde auch die Koloniemorphologie von Agar-Kulturen der verschiedenen Methanotrophen untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass von allen Stämmen auf Mineralsalzmedien unterschiedliche Kolonietypen ausgebildet wurden. Zwischen den für Methanotrophe typischen beige-farbenen, undurchsichtigen Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 2 bis 4 mm traten immer wieder sehr kleine (Durchmesser  $< 1$  mm), runde, erhabene und durchsichtige Kolonien auf. Im mikroskopischen Präparat dieser kleinen Kolonien wurde eine - im Vergleich zu den undurchsichtigen Kolonien - erhöhte Anzahl "sehr kleiner Stäbchen" nachgewiesen.

Die Kulturen der Methan oxidierenden Bakterien enthielten demnach Begleitorganismen bzw. Kontaminationen. Der Ursprung dieser Kontaminationen war unklar. Durch Überprüfung der Sterilität von Medien und Arbeitsschritten sollte gezeigt werden, ob die Verunreinigungen eingeschleppt wurden oder bereits in den Kulturen vorhanden waren, als die Arbeit mit ihnen begonnen wurde.

#### **4.1.2.2. Einschleppung von Verunreinigungen?**

Um den Ursprung der Verunreinigungen zu überprüfen, wurden Sterilitätskontrollen der Medien, des Arbeitsplatzes und der verschiedenen Arbeitsschritte vorgenommen.

Zur Überprüfung der Medien wurden unbeimpfte Kontrollansätze von NMS-Flüssigmedium nach Zugabe von Methan parallel zu Kultivierungen der Methanotrophen inkubiert. Es trat weder in diesen, noch in Langzeitinkubationen unbeimpfter Komplex- und Mineralsalzmedien sowie der verwendeten Stammlösungen bei 25°C Wachstum auf. Im Feuchtpräparat waren allerdings in verschiedenen Ansätzen zu Flöckchen aneinandergelagerte Strukturen zu erkennen, die in Form und Grösse den kleinen Verunreinigungen ähnelten. DAPI-Färbungen dieser inkubierten Medien(-bestandteile) zeigten, dass DNA in einem Teil der Flöckchen vorhanden war. Natürlich ist mit Hilfe dieser Färbung keine Aussage über die Lebensfähigkeit von Zellen möglich. Vitalfärbungen von durch Filtration aufkonzentrierten „Zellbestandteilen“ waren nicht möglich, da die Filtermembranen nach dem Autoklavieren sehr brüchig wurden und auch die Lichtdurchlässigkeit bei Montage in Immersionsöl nicht ausreichend war, um Zellumrisse deutlich er-

kennen zu können. In verschiedenen solcher Färbungen konnte keine CTF-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Neben den Medien wurde auch der Arbeitsplatz, die Sterilbank, überprüft. Dazu wurden Standard I, 1/10 Standard I und NMS-Agarplatten für 1 bis 2,5 h geöffnet auf die Arbeitsfläche gestellt. Die NMS-Platten wurden anschliessend mit Methan, die Komplexmedien unter Raumluft inkubiert. Nach bis zu zwei Wochen Bebrütung war auf keinem der Medien Wachstum feststellbar. Demnach konnten die Verunreinigungen weder über verunreinigte Medien noch über unsaubere Arbeitsschritte in die Kulturen eingebracht worden sein.

Eine mögliche Einschleppung ungewöhnlicher Zellen in mikroskopische Präparate wurde durch Verwendung autoklavierten und sterilfiltrierten Wassers zur Herstellung der Feuchtpräparate ausgeschlossen. Das zum Suspendieren verwendete Wasser wurde zudem parallel zu den Kulturen mikroskopisch kontrolliert. Weiterhin wurden Objektträger und Deckgläser mit 70 %-igem Ethanol gereinigt.

Auch die Probenahme bei der Herstellung der Präparate wurde überprüft, es konnten aber keine Unterschiede zwischen einer Entnahme der Proben mit einer sterilisierten Impföse oder einer sterilen Mikroliter-Pipettenspitze festgestellt werden. Um eine Verunreinigung der Kulturen bei der Probenahme auszuschließen, wurden die zu beprobenden Serumflaschen nicht mehr geöffnet, sondern die Proben mit Hilfe steriler Einmalspritzen und Kanülen entnommen.

Die Überprüfung der Arbeitsschritte und Medien ergab eindeutig, dass die Verunreinigungen nicht eingeschleppt wurden. Es war daher davon auszugehen, dass keine nach strenger Definition als Reinkulturen zu bezeichnenden Stämme vorlagen. Vor eventuellen Untersuchungen zur Physiologie dieser Bakterien war daher zunächst eine Aufreinigung der Kulturen nötig.

#### **4.1.3. Versuche zur Aufreinigung methanotropher Kulturen**

Zur Aufreinigung der Kulturen wurden verschiedene Herangehensweisen getestet:

1. Aufreinigung der Methanotrophen durch sukzessives Ausverdünnen der Verunreinigung(en) über Subkultivierungen auf Mineralsalzmedien und Inkubation mit Methan

2. Anreicherung der Kontaminante(n) und nach partieller Sequenzierung und ungefährender Einordnung in eine Mikroorganismengruppe gezielte Bekämpfung z.B. mit Antibiotika.

Zur Aufreinigung der Methanotrophen durch „Ausverdünnen“ der Verunreinigung wurden Einzelkolonien von NMS-Agarplatten, die von der Koloniemorphologie her den Angaben für Methanotrophe entsprachen (beige, undurchsichtig, rund) ausgewählt. Diese wurden auf NMS- und AMS-Agarplatten überimpft und unter Zugabe von Methan inkubiert. Nach Auftreten der ersten sichtbaren Kolonien wurde erneut überimpft. Bei verlängerter Inkubation bis zum Aufwachsen deutlich sichtbarer Kolonien traten auch in den Subkulturen immer wieder unterschiedliche Kolonietypen sowie verschiedene Zelltypen auf.

Auch in Flüssigmedien wurden Subkultivierungen durchgeführt. Es wurden Ansätze parallel täglich und jeden zweiten Tag überimpft. Nach mehreren Passagen blieb in den überimpften Ansätzen eine Trübung aus. Die letzten bewachsenen Ansätze enthielten nach verlängerter Inkubation erneut neben den für Methanotrophe typischen Zellen die "sehr kleinen Stäbchen".

Durch sukzessives Ausverdünnen der Begleitorganismen konnte demnach keine Aufreinigung der Methan oxidierenden Bakterien erreicht werden. Daher wurde versucht, die Kontaminanten hoch anzureichern, um sie anschliessend über PCR basierende Methoden zu identifizieren und gezielt zu bekämpfen. Dazu wurden zunächst Subkultivierungen auf verschiedenen Agarmedien vorgenommen. Es wurden sowohl Standardmedien für heterotrophe Organismen als auch ausgewählte Medien mit geringen Kohlenstoffkonzentrationen verwendet (Kapitel 3.1.3). Die auf Agarmedien beobachteten verschiedenen Kolonietypen wiesen darauf hin, dass die als „sehr kleine Stäbchen“ bezeichnete Kontamination in durchsichtigen kleinen Kolonien aufwuchs, während die Methanotrophen undurchsichtige beigefarbene Kolonien ausbildeten. Es wurde daher versucht, die durchsichtigen Kolonien von den beigefarbenen durch Subkultivierungen zu trennen.

Waren die Kulturen auf Agarmedium in zwei Kolonietypen gewachsen, wurden beide Kolonietypen getrennt auf gleiches Medium überimpft. Bereits nach der zweiten Subkultivierung wuchsen nur größere, beigefarbene Kolonien auf, die allerdings einen durchsichtigen Rand hatten und im mikroskopischen Präparat "sehr kleine Stäbchen" enthielten. Es war nicht möglich, eine stabile Kultur der "sehr kleinen Stäbchen" zu etablieren. Mikroskopische Präparate beider Kolonie-

typen enthielten immer sowohl die "sehr kleinen Stäbchen" als auch den Methanotrophen gleichende, abgerundete Zellen.

Die durchsichtigen Kolonien traten nur in enger räumlicher Nachbarschaft zu den größeren weißlichen bis cremefarbenen Kolonien auf. Möglicherweise ist dies auf eine stoffwechselphysiologische Beziehung zwischen den "sehr kleinen Stäbchen" und den Methanotrophen zurückzuführen. Da eine Aufreinigung der Kontamination auf verschiedenen Komplexmedien nicht möglich war, sie aber in den Kulturen der Methanotrophen immer wieder auftraten wurde versucht, die Verunreinigungen in Kulturüberstand methanotropher Kulturen und in NMS unter Zusatz von Methanol anzureichern. In Ansätzen mit Methanol kam es zu keiner Trübung. Auch mikroskopisch konnte keine Anreicherung der "sehr kleinen Stäbchen" nachgewiesen werden.

In Ansätzen mit durch Abzentrifugieren oder Filtrieren durch 0,2 µm Membranen gewonnenem Kulturüberstand (Kapitel 3.1.3.1) kam es ohne weiteres Inokulum bei Methanzugabe zu einer Trübung, während ohne Methan keine Trübung auftrat. Mikroskopisch waren aber auch im Ansatz ohne Methan Zellen nachweisbar. Wurden die Kulturen allerdings zunächst abzentrifugiert und der Überstand anschliessend durch 0,2 µm Membranen filtriert, trat weder mit noch ohne Methan Wachstum auf. Erst diese zweifache Reinigung des Kulturüberstands führte demnach zu einer vollständigen Entfernung der Zellen aus dem Kulturüberstand. Das Wachstum der Bakterien im unbeimpften Kulturüberstand war eindeutig Methan abhängig. Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass sowohl abgerundete Zellen (Methanotrophe) als auch "sehr kleine Stäbchen" in allen nur einfach aufgereinigten Ansätzen auftraten. Da Wachstum aber nur nach Zugabe von Methan auftrat, müssten a) beiden Bakterientypen Methanotrophe sein oder b) der Begleitorganismus die im Kulturüberstand enthaltenen Verbindungen nicht für sein Wachstum verwerten können, sondern direkt auf ein Wachstum der Methanotrophen angewiesen sein.

Subkultivierungen auf verschiedenen Festmedien führten immer zum einmaligen Aufwachsen der beschriebenen zwei verschiedenen Kolonietypen. In Subkultivierungen der kleinen durchsichtigen Kolonien auf Komplexmedien blieb ein Wachstum aber aus.

Es war nicht möglich, die Verunreinigung mit Hilfe der verschiedenen Ansätze zu isolieren. Eine gewisse Anreicherung schien allerdings in Kulturüberstand von

methanotrophen Kulturen möglich zu sein. Für weiterführende Untersuchungen dieser Kontamination könnte daher ein der Zusammensetzung des Kulturüberstandes angeglichenes Medium geeignet sein. Wie tägliche HPLC-Analysen (Kapitel 3.1.4) des Überstands einer in NMS-Flüssigmedium gewachsenen RP1-Kultur zeigten, könnte ein solches Medium z.B. 0,5 – 1,55 mM Methanol, 0,01 – 0,07 mM Formiat, 0,04 mM Acetat, 0,03 mM Propionat und 0,05 – 0,09 mM Butyrat enthalten. Neben diesen definierten Substanzen ergab die Analyse auch einige undefinierte Peaks. Ein solches Medium wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angewandt.

Nach den oben dargestellten Ergebnissen war keine Aufreinigung der Kulturen der Methan oxidierenden Bakterien möglich. Es war im Sinne der strengen Definition einer Reinkultur nicht sicher nachzuweisen, dass eine solche für Methanotrophe vorlag.

#### **4.1.4. Partielle Sequenzierung von Kulturen Methan oxidierender Bakterien.**

Zur Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-Sonden für einen Nachweis beider Familien der Methanotrophen mit FISH war weiteres Arbeiten mit den Stammkulturen der Methan oxidierenden Bakterien erforderlich. Um sicherzustellen, dass die Hauptmasse der Zellen einer Kultur wirklich der angegebenen Art zuzuordnen war, wurde die 16S rDNA der Stammkulturen teilweise sequenziert (Kapitel 3.4.8.7). Die erhaltenen Sequenzen der Stämme *Methylosinus trichosporium* (NCIMB 11131), *Methylocystis parvus* (NCIMB 11129), *Methylosinus sporium* (Subkultur von NCIMB 11126), *Methylobacter luteus* (NCIMB 11914), *Methylococcus capsulatus* (NCIMB 11853) und *Methylomicrobium album* (NCIMB 11123) zeigten in der Distanzanalyse (ARB) nur geringe Abweichungen zu Vergleichssequenzen der jeweiligen Art (< 2 %). Diese Stämme wurden daher als Referenzen in den Hybridisierungen eingesetzt.

Die Sequenzierung des Stammes *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128) ergab eine hohe Sequenzhomologie zur Gattung *Methylocystis*. Dieser Stamm gehört demnach nicht zur Familie der *Methylococcaceae* (Typ I), sondern zur Familie der *Methylocystaceae* (Typ II). Diese Klassifizierung bestätigte sich auch in Experimenten mit FISH mit den familienspezifischen Sonden (Anhang 1) und in PCR-Amplifikationen, in denen *Methylobacter whittenburyi* immer wie ein Typ II

Methanotropher reagierte. Für die Entwicklung familienspezifischer Sonden für Methanotrophe wurde dieser Stamm daher nicht mehr als Referenz eingesetzt. Untersuchungen der NCIMB an den Stammkonserven von *Methylobacter whittenburyi* bestätigten die Homologie zu *Methylocystis* (P. N. Green, NCIMB, persönliche Mitteilung).

#### **4.1.5. Anpassung von FISH für die familienspezifische Detektion Methanoxidierender Bakterien**

Durch die Verwendung von Oligonukleotidsonden in der Ganzzellhybridisierung ist der spezifische Nachweis von Bakteriengruppen in Umweltproben möglich. Die bisher für Methanotrophe bekannten Sonden detektierten allerdings nur einzelne Gattungen der Methanotrophen oder waren nicht ausschliesslich für Methanotrophe spezifisch, so dass ein quantitativer Nachweis von Typ I und Typ II in Umweltproben mit FISH bisher nicht möglich war. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der ARB-Software (Strunk und Ludwig 1996) Sonden entwickelt werden, die für die verschiedenen Gattungen der jeweiligen Familie spezifisch waren und nicht-methanotrophe Bakterien nicht detektierten (Kapitel 3.4.7). Die Sequenzen dieser Sonden, die für ihre Spezifität nötige Formamidkonzentration sowie die in den Hybridisierungen verwendeten nicht-methanotrophen Referenzstämme sind in Tabelle 2 im Anhang 1 zusammengefasst. (Für eine genauere Darstellung der Methodenentwicklung siehe Anhang 1 "Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation".)

Für den Nachweis der Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* der Typ II Methanotrophen wurden zwei Sonden entwickelt, Mx450 und Mx464. Sie unterschieden sich in der Position ihrer zwei Fehlpaarungen zu nicht-methanotrophen Bakterien und in der Signalintensität in FISH. Die Sonde Mx450 zeigte im visuellen Vergleich der Fluoreszenzsignale eine höhere Intensität als die universelle Eubakteriensonde Eub338, während das Mx464-Signal dem der Eub338 Sonde vergleichbar war. Die hohe Signalintensität von Mx450 ist besonders für die Anwendung in Umweltproben mit Autofluoreszenz wichtig, da hier schwache Sonden signale kaum erkannt werden können.

Beide Typ II Sonden waren bei Verwendung von 20 % Formamid im Hybridisie-



rungepuffer spezifisch für Methanotrophe. Der nicht-methanotrophe Referenzstamm *Caulobacter crescentus* (2 Fehlpaarungen) zeigte bei dieser Formamidkonzentration kein Signal mehr und auch die Signalintensität der *Methylosinus trichosporium* Zellen (0 Fehlpaarungen) ging bereits zurück.

Für die Typ I Methanotrophen wurden sechs Sonden entworfen und in FISH getestet. Sie unterschieden sich in der Zahl der Typ I Gattungen, die theoretisch detektiert werden könnten, d.h. Sequenzidentität zur Sondenzielsequenz aufwiesen. Die Sonden M<sub>γ</sub>84, 705, 983 und 993 zeigten Sequenzidentität zu allen Typ I Gattungen, während M<sub>γ</sub>669 eine Fehlpaarung zu *Methylobacterium* und *Methylococcus* Arten aufwies. Die Sonde M<sub>γ</sub>1004 dagegen war zur Sequenz von *Methylobacterium* identisch, hatte aber mindestens eine Fehlpaarung zu anderen Typ I Gattungen.

Bei Verwendung der Typ I Sonden für die FISH-Detektion der Stämme *Methylobacter luteus*, *Methylobacterium album* und *Methylococcus capsulatus* resultierten nur M<sub>γ</sub>84 und M<sub>γ</sub>704 in vergleichbaren Signalintensitäten für alle Stämme. Die Sonden M<sub>γ</sub>983 und M<sub>γ</sub>993 dagegen ergaben nur sehr schwache Signale, obwohl auch sie keine Fehlpaarungen der Sequenzen aufwiesen. Dies kann auf die Faltung des 16S rRNA-Moleküls im Ribosom zurückgeführt werden (Kapitel 5.2.2.3).

Die Hybridisierung reflektierte ansonsten die Ergebnisse der theoretischen Analyse. So führte z.B. die eine Fehlpaarung von M<sub>γ</sub>669 zu *Methylobacterium album* Sequenzen zu einem deutlich schwächeren Signal mit diesem Stamm im Vergleich zur Signalintensität von *Methylobacter luteus*. Keine der für Typ I Methanotrophe entwickelten Sonden ergab ein Signal mit dem Typ II Referenzstamm *Methylosinus trichosporium*. Nach weiterführenden Tests mit mehr Stämmen der verschiedenen Gattungen könnten die Sonden M<sub>γ</sub>669 und M<sub>γ</sub>1004 zu gattungsspezifischen Sonden (M<sub>γ</sub>669: *Methylobacter* und *Methylobacterium*, M<sub>γ</sub>1004: *Methylobacterium*) weiterentwickelt werden.

Da nur die Sonden M<sub>γ</sub>84 und M<sub>γ</sub>704 alle Gattungen der Typ I Methanotrophen detektierten, wurden sie für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Signalintensität der jeweils einzelnen Sonde war deutlich geringer als die der Eub338-Sonde, konnte allerdings durch gleichzeitige Hybridisierung der Zellen mit beiden Sonden (mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert) gesteigert werden. Wie auch die Typ II spezifischen Sonden waren die Typ I Sonden bei einer Formamidkon-

zentration von 20 % für Methanotrophe spezifisch.

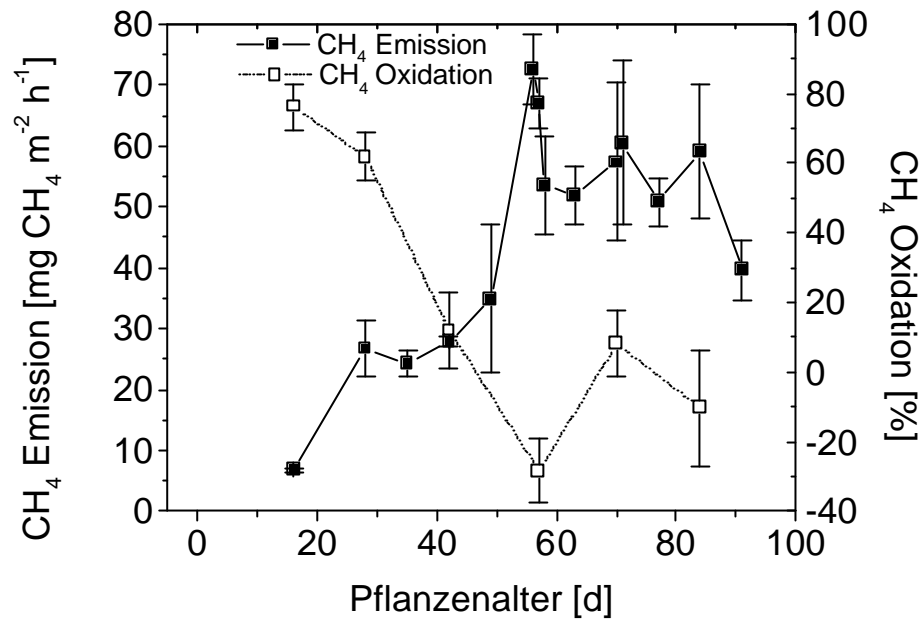
In Hybridisierungen von Rhizoplane-Proben aus dem Mikrokosmenexperiment konnte gezeigt werden, dass beide Familien der Methanotrophen mit den neuen Sonden spezifisch nachgewiesen werden. Die Sondensignale konnten gut von der Autofluoreszenz der Wurzelfragmente unterschieden werden (Anhang 1). Damit war eine Methode zur quantitativen *in-situ* Detektion der beiden Familien der Methan oxidierenden Bakterien verfügbar.

## **4.2. Untersuchungen zur Aktivität und Populationsdynamik Methan oxidierender Bakterien an Reismikrokosmen**

Die Aktivität Methan oxidierender Bakterien hat entscheidenden Einfluss auf die Methanemission aus gefluteten Reisfeldern. Die Entwicklung der Aktivität und Populationsstruktur der Methanotrophen im durch die Reispflanze beeinflussten System wurde zunächst mit Hilfe kompartmentierter Mikrokosmen untersucht. Dieses Modellsystem ermöglichte die Einstellung konstanter Umweltparameter wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Lichtintensität, und verringerte somit die im Reisfeld beobachteten Schwankungen dieser Umweltparameter.

### **4.2.1. Methanemission und *in-situ* Methanoxidation**

Methanemissionen aus Reisfeldern wiesen in der Regel zwei Maxima auf, wovon eins zu Beginn der Saison auftrat (Krüger 2000). Dieses Emissionsmaximum wird auf den Abbau von organischem Material (z.B. Stroh) zurückgeführt. Auch im Mikrokosmenexperiment änderten sich die Methan-emissionsraten im Laufe der Vegetationsperiode: Sie stiegen während der ersten 50 Tage nach dem Auspflanzen auf Werte von  $35 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  an (Abbildung 4.2). Zu Beginn der Blüte der Reispflanzen nach etwa 55 Tagen trat ein Maximum der Methanemission mit etwa  $70 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  auf. Im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode sank die Emissionsrate auf Werte von  $55 \text{ mg CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ab und blieb bis zum Ende der Untersuchungen (Pflanzenalter 90 Tage) relativ konstant bei diesem Wert. Das in Reisfeldern beobachtete Emissionsmaximum zu Beginn der Saison wurde im Mikrokosmos nicht beobachtet.



**Abbildung 4.2: Methanemission und *in-situ* Methanoxidation über die Vegetationsperiode von Reis in kompartimentierten Mikrokosmen.** Mittelwert  $\pm$  SF ( $n = 4$ ). Der Anteil der *in-situ* Methanoxidation wurde aus der Differenz der Flüsse mit und ohne Inhibitor ( $\text{CH}_2\text{F}_2$ ) berechnet (Kapitel 3.4.2).

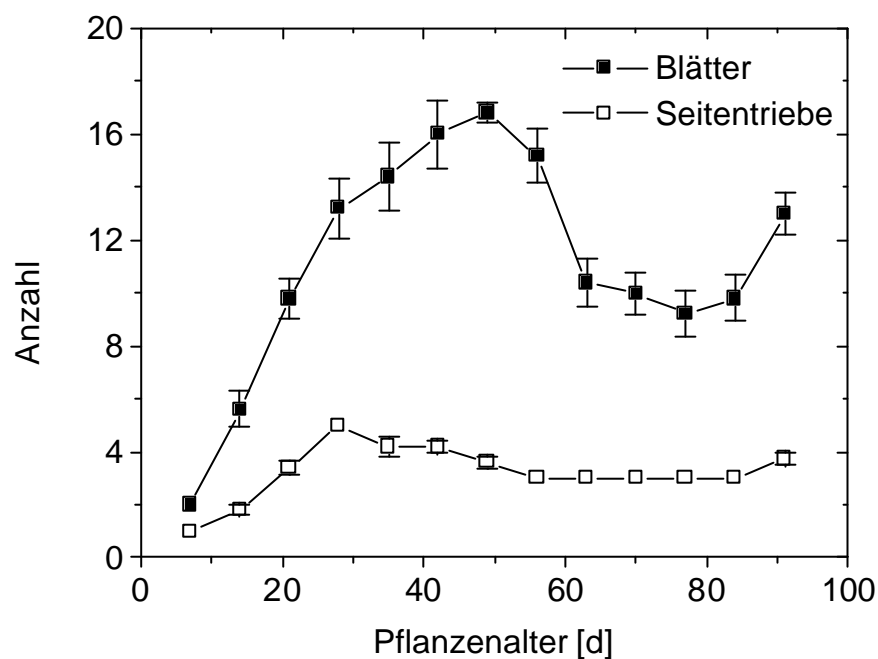
Die *in-situ* Methanoxidation hatte nur einen kurzzeitigen Einfluss auf die Methanemission der Mikrokosmen. Sie erreichte bei jungen Pflanzen hohe Werte von ca. 80 %, ging aber mit zunehmendem Pflanzenalter stetig zurück und war bereits nach ca. 60 Tagen sehr gering (Abbildung 4.2). Ein Vergleich der *in-situ* Oxidation und der Pflanzenwachstumsphase (Abbildung 4.3) wies auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Methanotrophen und dem Wachstumsstadium der Pflanzen hin, da die Methanoxidation zu Beginn der Pflanzenblüte (55 – 60 Tage nach Auspflanzen) auf Werte um 0 % abfiel und im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode nicht mehr nachweisbar war.

In den Flussmessungen war die Wirkung des Hemmstoffs Difluormethan ( $\text{CH}_2\text{F}_2$ ) innerhalb von 20 bis 40 min nach Zugabe anhand erhöhter Methanemissionen im Vergleich zu Kontrollansätzen feststellbar. Um eine mögliche längerfristige Beeinflussung des Systems durch den Hemmstoff zu untersuchen, wurden die Methanflüsse der behandelten Mikrokosmen auch einen und 14 Tage nach der Hemmstoffmessung erneut bestimmt. Im Vergleich zu Kontrollmikrokosmen zeigten die behandelten Mikrokosmen einen Tag nach der Hemmstoffbehandlung deutlich

niedrigere Methanemissionen (durchschnittlich 30 %). Diese waren allerdings 14 Tage nach der Hemmstoffmessung wieder vergleichbar. Die Varianz der Methanemissionen zwischen den einzelnen Mikrokosmen war mit  $\pm 50\%$  vom Mittelwert sehr hoch. Dies konnte auf die biologische Varianz der einzelnen Pflanzen zurückgeführt werden, und führte auch zu den negativen Werten der *in-situ* Methanoxidation während der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode.

#### 4.2.2. Entwicklung der Reispflanzen im Mikrokosmos

Die Entwicklung der Pflanzen ist in Abbildung 4.3 anhand der Anzahl der Blätter und Sprosse dargestellt.



**Abbildung 4.3: Entwicklung der Biomasse der Reispflanzen über die Vegetationsperiode im Mikrokosmenexperiment.** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 5)

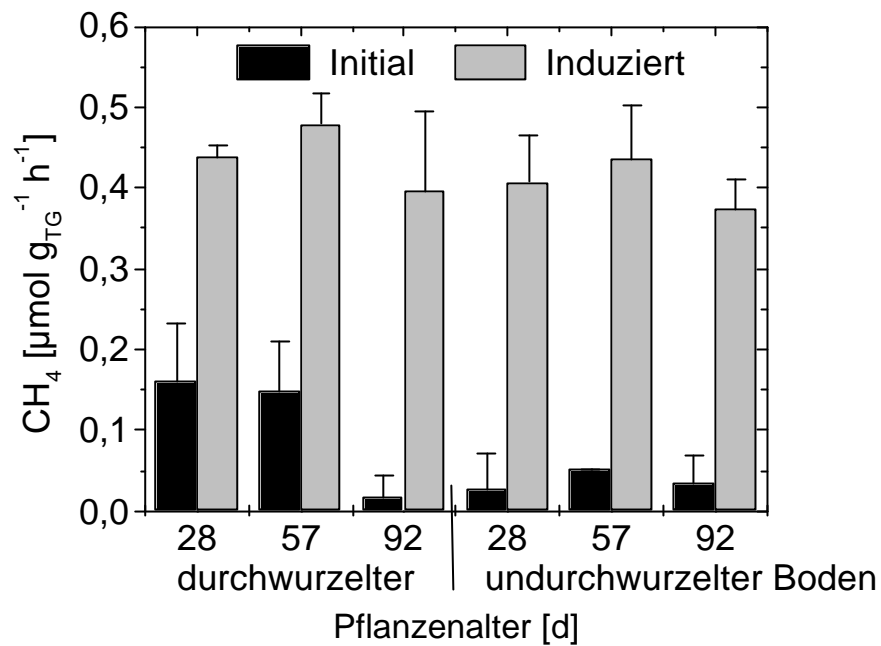
Die Blattzahl pro Pflanze erreichte ihren Maximalwert nach 55 Tagen. Dies war auch der Zeitpunkt, zu dem die Blütenbildung begann und die Pflanzen somit von der vegetativen in die reproduktive Wachstumsphase übergingen. Die Abnahme der Blattanzahl in der zweiten Hälfte der Saison ist auf ein Absterben der Blätter während der Samenreifung zurückzuführen.

#### 4.2.3. Potentielle Methanoxidation in Bodensuspensionen und an Wurzeln verschieden alter Reispflanzen

Messungen von Umsatzraten nach Aufhebung von Stoffwechsellimitierungen (hier: Zugabe von Methan und Luftsauerstoff) können Aufschluss über die maximal mögliche Aktivität einer Bakterienpopulation im System unter optimalen Bedingungen (potentielle Aktivität) geben. Die Initialrate wird als Parameter für die im System selbst vorliegende Aktivität gewertet, da zu Beginn der Messungen noch kein Wachstum der Bakterien im Ansatz erfolgen konnte. Die induzierte Rate charakterisiert die Aktivität in der Probe nach Anpassung an die optimierten Umgebungsbedingungen. Die Lag-Phase spiegelt die Dauer dieses Anpassungsprozesses wieder.

Die Messungen der potentiellen Methanoxidation in Bodensuspensionen ergaben sehr gute Übereinstimmungen (Abweichungen < 3 %) der drei parallelen Ansätze eines Mikrokosmos. Die biologische Varianz zwischen den vier Pflanzen eines Alters war allerdings zu erkennen, überschritt aber in keinem Fall einen Fehler von 30 %. Die Wurzelproben der Mikrokosmenexperimente zeigten dagegen Unterschiede zwischen den Parallelen einer Pflanze von 5 - 10 % und zwischen den vier Pflanzen eines Alters von 15 - 100 %. Dennoch war es möglich, aus den Mittelwerten dieser Untersuchungen eine Entwicklung der potentiellen Methanoxidation über die Vegetationsperiode abzuleiten.

Im Mikrokosmenexperiment waren die **Initialraten** (Kapitel 3.4.5) im undurchwurzelter Boden über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr gering (von 0,03 bis 0,05  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), mit einem leichten Maximum im Pflanzenalter von 57 Tagen (Abbildung 4.4). Dagegen waren die Initialraten im durchwurzelter Boden mit 0,16  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei jungen Pflanzen 5-fach höher, nahmen aber mit zunehmendem Pflanzenalter stetig auf 0,02  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  ab. Im Pflanzenalter von 92 Tagen war die Initialrate im durchwurzelter Boden geringer als die des undurchwurzelter Bodens. Auch an den Wurzeln scheint eine stetige Abnahme der Initialrate mit zunehmendem Pflanzenalter aufzutreten. Sie ging von 0,37  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 28 Tage alten Pflanzen auf 0,16  $\mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 92 Tage alten Pflanzen zurück. Aufgrund des Fehlens der Werte für 57 Tage alte Pflanzen ist eine eindeutige Aussage darüber allerdings nicht möglich.



**Abbildung 4.4: Saisonale Änderung der potentiellen Methanoxidationsraten in Bodensuspensionen aus Reismikrokosmen.** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 4).

Die **induzierten Raten** waren für die Bodenkompartimente über den Untersuchungszeitraum konstant bei Werten um  $0,4 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$ , wobei die Werte im durchwurzelter Boden etwas höher waren als die im undurchwurzelter Boden. An den Wurzeln wurde eine starke Abnahme der induzierten Rate mit zunehmendem Pflanzenalter von  $3,3 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  auf  $0,74 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  beobachtet.

In den Bodenkompartimenten und an den Wurzeln konnte sowohl im Mikrokosmosexperiment als auch im Feld (Kapitel 4.3.3) die Methanoxidation *in-vitro* induziert werden. An den Pflanzensprossen hingegen wurde zu keinem Zeitpunkt Methanoxidation nachgewiesen.

Die **Lag-Phasen** waren in den Bodenkompartimenten der Mikrokosmen über die gesamte Vegetationsperiode konstant. Im durchwurzelter Boden waren sie mit Werten um 7 Stunden etwa 3-mal niedriger als im undurchwurzelter Boden mit 21 bis 26 Stunden (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Lag-Phasen in Messungen der potentiellen Methanoxidation mit Proben der Kompartimente verschieden alter Mikrokosmen.** Mittelwerte  $\pm$  SF (n = 2-4), Angaben in Stunden [h]; n.b. nicht bestimmt

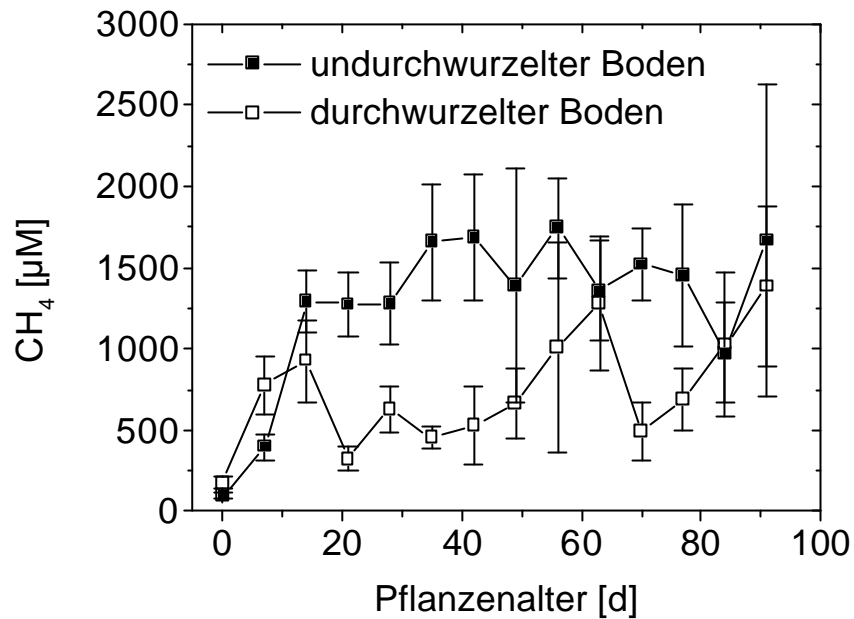
Pflanzen- alter	undurchwurzelter Boden	durchwurzelter Boden	Wurzeln
28 Tage	21,1 $\pm$ 1,9	7,7 $\pm$ 0,8	16 $\pm$ 0,5
57 Tage	26,4 $\pm$ 2,3	7,6 $\pm$ 0,8	n.b.
92 Tage	22,9 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,5	51,5 $\pm$ 1,6

Die an den Wurzeln gemessenen Lag-Phasen waren deutlich länger als die der Bodenkompimente. An den Wurzeln kam es zu einer Zunahme der Lag-Phase mit zunehmendem Pflanzenalter, die parallel zur Abnahme der *in-situ* Oxidation auftrat.

#### 4.2.4. Porenwasseranalytik

Zur näheren Charakterisierung der Umgebung der Methan oxidierenden Bakterien im Mikrokosmos und zur Bestimmung möglicher limitierender oder hemmender Einflüsse wurden die Methan- und Ammoniumkonzentrationen sowie der pH-Wert des Porenwassers bestimmt.

Die Methankonzentrationen im Bodenporenwasser stiegen während der ersten zwei Wochen des Pflanzenwachstums stark an (Abbildung 4.5). Im undurchwurzelten Boden erreichten sie nach 30 bis 40 Tagen den Sättigungswert der Löslichkeit in Wasser (1560  $\mu$ M bei 20 °C) und blieben konstant bis zum Ende der Vegetationsperiode. Im durchwurzelten Boden waren die Methankonzentrationen geringer, fielen aber zu keinem Zeitpunkt unter 500  $\mu$ M ab. Auch für die Methankonzentration im Porenwasser des durchwurzelten Kompartiments war - wie für die Methanemission - ein Maximum zu Beginn der reproduktiven Wachstumsphase der Pflanzen (Pflanzenalter ~55 Tage) feststellbar.

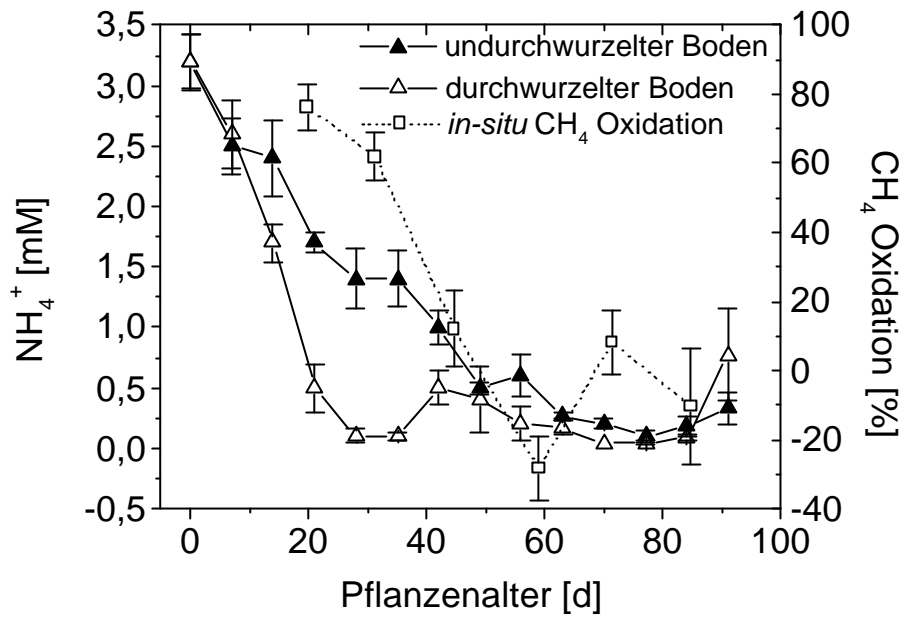


**Abbildung 4.5: Methankonzentrationen im Porenwasser kompartimentierter Mikrokosmen über die Vegetationsperiode von Reis.** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 3 - 6)

Die über dem Löslichkeitsprodukt von Methan in Wasser liegenden Werte sind auf eine parallele Entnahme von Porenwasser und kleinen Gasblasen aus dem Boden zurückzuführen.

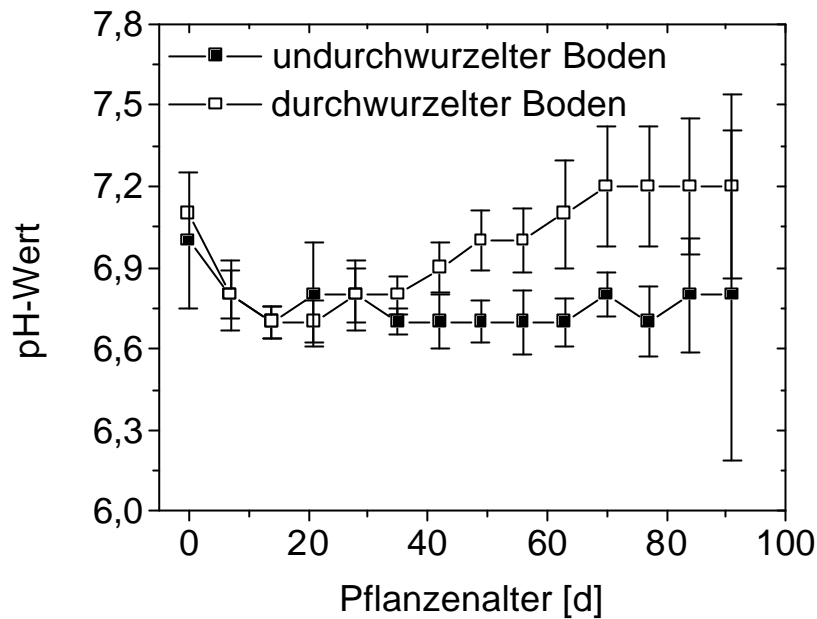
Die **Ammoniumkonzentration** im Porenwasser der Mikrokosmen nahm trotz wöchentlicher Düngung im durchwurzelten Boden innerhalb von 21 Tagen Pflanzenwachstum auf Werte an der Nachweisgrenze ab (Abbildung 4.6). Im undurchwurzelten Boden erfolgte die Abnahme etwas langsamer, aber ebenso stetig. Die schnelle Ammoniumabnahme im durchwurzelten Boden korrelierte mit dem Pflanzenwachstum und konnte daher hauptsächlich auf die Aufnahme des Ammoniums durch die Pflanze zurückgeführt werden. Durch Diffusion und Transpirationssog gelangte auch das Ammonium aus dem undurchwurzelten Boden in den inneren, durchwurzelten Zylinder der Mikrokosmen und konnte dort durch die Pflanze aufgenommen werden. Die wöchentlichen Düngergaben reichten nicht aus, um einen konstant hohen Ammoniumgehalt im Porenwasser zu erhalten.





**Abbildung 4.6: Änderung der Ammoniumkonzentration im Porenwasser des durchwurzelten und undurchwurzelten Bodens in Reismikrokosmen im Vergleich zur Entwicklung der *in-situ* Methanoxidation.** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 3 - 6). Die *in-situ* Methanoxidation ist auch in Abbildung 4.2 dargestellt und wurde aus der Differenz der Methanflüsse mit und ohne Inhibitor ( $\text{CH}_2\text{F}_2$ ) berechnet (Kapitel 3.4.2).

Der **pH**-Wert im Porenwasser der Mikrokosmen fiel während der ersten 2 Wochen nach Bepflanzen auf Werte von pH 6,7 - 6,8 ab (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7: Entwicklung der pH-Werte im Porenwasser kompartmentierter Mikrokosmen über die Vegetationsperiode von Reis.** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 3 - 6)

Im undurchwurzelten Boden blieb der pH über die gesamte Versuchsdauer konstant bei diesem Wert. Im durchwurzelten Boden dagegen stieg der pH nach 35 Tagen bis zum Versuchsende stetig an und erreichte nach 90 Tagen einen Wert von pH 7,2. Die pH-Werte im Porenwasser lagen während der gesamten Vegetationsperiode im neutralen Bereich und beeinträchtigten daher die Methanotrophen höchstwahrscheinlich nicht.

#### 4.2.5. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der sich ändernden Methanoxi-dationsaktivität und Entwicklungen der Population der Methan oxidierenden Bakterien zu untersuchen, wurde die Gesamtzellzahl der Methanotrophen in Boden- und Wurzelkompartimenten der Mikrokosmen bestimmt (Kapitel 3.4.6). Die deutlichste Zellzahländerung wurde im Mikrokosmenexperiment an der Rhizoplane beobachtet, wo die Anzahl der Methanotrophen von  $1 \times 10^7 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei 20 Tage alten Pflanzen auf  $4,7 \times 10^7$  bei 57 Tage und  $1 \times 10^8 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei 85 Tage alten Pflanzen anstieg (Tabelle 4.3). Auch im Wurzelhomogenisat wurde ein Anstieg der Zellzahl beobachtet, der parallel zur Zellzahlzunahme auf der

Rhizoplane stattfand.

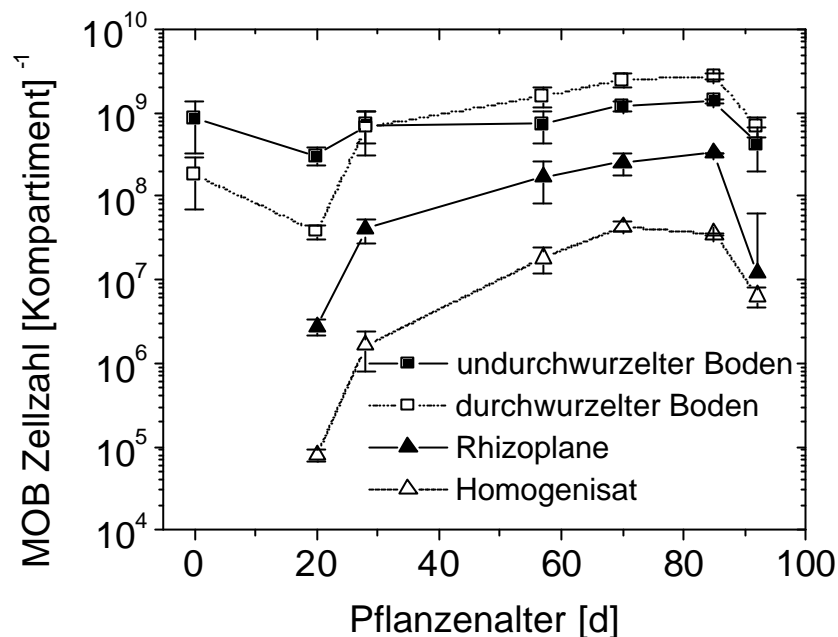
**Tabelle 4.3: Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien über die Vegetationsperiode von Reis in den verschiedenen Kompartimenten der Mikrokosmen.** Die Zellzahlen wurden über MPN bestimmt (Kapitel 3.3.3). **Fett:** Mittelwert  $\pm$  SF (n = 4), *kursiv:* Mittelwert  $\pm$  SF (n = 2), normal: Werte eines Mikrokosmos´.

Pflanzen- alter [d]	undurchwurzelter Boden $\cdot 10^5 [g_{TG}^{-1}]$	durchwurzelter Boden $\cdot 10^5 [g_{TG}^{-1}]$	Rhizoplane $\cdot 10^5 [g_{TG}^{-1}]$	Homogenisat $\cdot 10^5 [g_{TG}^{-1}]$
0	$17 \pm 10$	$17 \pm 10$		
20	$6,1 \pm 1,4$	$3,6 \pm 0,7$	$116 \pm 24$	$3,3 \pm 0,5$
<b>28</b>	<b><math>14,7 \pm 6,2</math></b>	<b><math>64 \pm 35</math></b>	<b><math>391 \pm 130</math></b>	<b><math>15,3 \pm 8,4</math></b>
<b>57</b>	<b><math>14,7 \pm 0,6</math></b>	<b><math>150 \pm 39</math></b>	<b><math>472 \pm 200</math></b>	<b><math>41 \pm 14</math></b>
71	$24,1 \pm 3,0$	$238 \pm 49$	$837 \pm 259$	$141 \pm 20$
85	$27,9 \pm 1,9$	$262 \pm 25$	$1210 \pm 26$	$129 \pm 2,9$
<b>92</b>	<b><math>8,5 \pm 4,6</math></b>	<b><math>66 \pm 17</math></b>	<b><math>361 \pm 150</math></b>	<b><math>19,4 \pm 5,3</math></b>

Im durchwurzelten Boden wurde eine deutliche Zunahme der Anzahl der Methanotrophen von  $1,7 \times 10^6 g_{TG}^{-1}$  am Tag des Auspflanzens auf  $1,5 \times 10^7 g_{TG}^{-1}$  nach 57 Tagen und  $2,6 \times 10^7 g_{TG}^{-1}$  nach 85 Tagen Pflanzenwachstum festgestellt. Im undurchwurzelten Boden blieben die Zellzahlen der Methanotrophen über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant bei einem mittleren Wert von  $1,6 \times 10^6 g_{TG}^{-1}$ . Dieser Unterschied der Zellzahlen in den beiden Bodenkompartmenten zeigte deutlich den positiven Einfluss der Reisswurzel auf das Wachstum der Methan oxidierenden Bakterien. Die Werte für 71 und 85 Tage alte Pflanzen wiesen auf ein Maximum der Zellzahlen nach der Blüte der Pflanzen hin. Während der Reifung der Samen nahmen die Zellzahlen wieder ab.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Zellzahlen in den Boden- und Wurzelkompartimenten wurden diese auch für die Gesamtmasse des jeweiligen Kompartiments berechnet (Abbildung 4.8). Dadurch konnte die Bedeutung der Kompartimente für

die Methanotrophen im Mikrokosmos System besser abgeschätzt werden.



**Abbildung 4.8: Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien (MOB) über die Vegetationsperiode von Reis in verschiedenen Kompartimenten der Mikrokosmen.** Angegeben sind die pro Masse des jeweiligen Kompartiments berechneten Mittelwerte mit Standardfehlern von vier parallelen Mikrokosmen (28, 57, 92 Tage alte Pflanzen) bzw. von einem Mikrokosmos (21, 71 Tage alte Pflanzen) sowie die Werte zweier Proben vor dem Auspflanzen und für 85 Tage alte Pflanzen.

Im Gegensatz zu den pro Gramm Trockengewicht berechneten Werten lagen die Zellzahlen pro Kompartiment im durchwurzelten und undurchwurzelten Boden deutlich über den Zellzahlen der Rhizoplane. Durch die grössere Gesamtmasse an undurchwurzeltem Boden wurde in dieser Darstellung der Einfluss der Wurzeln auf den sie umgebenden Boden weniger deutlich. Diese Berechnung stellt die Bedeutung des jeweiligen Kompartiments für das Gesamtsystem in den Vordergrund. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die Bodenkompimente für die Anzahl der Methanotrophen insgesamt letztlich die grösste Bedeutung hatten.

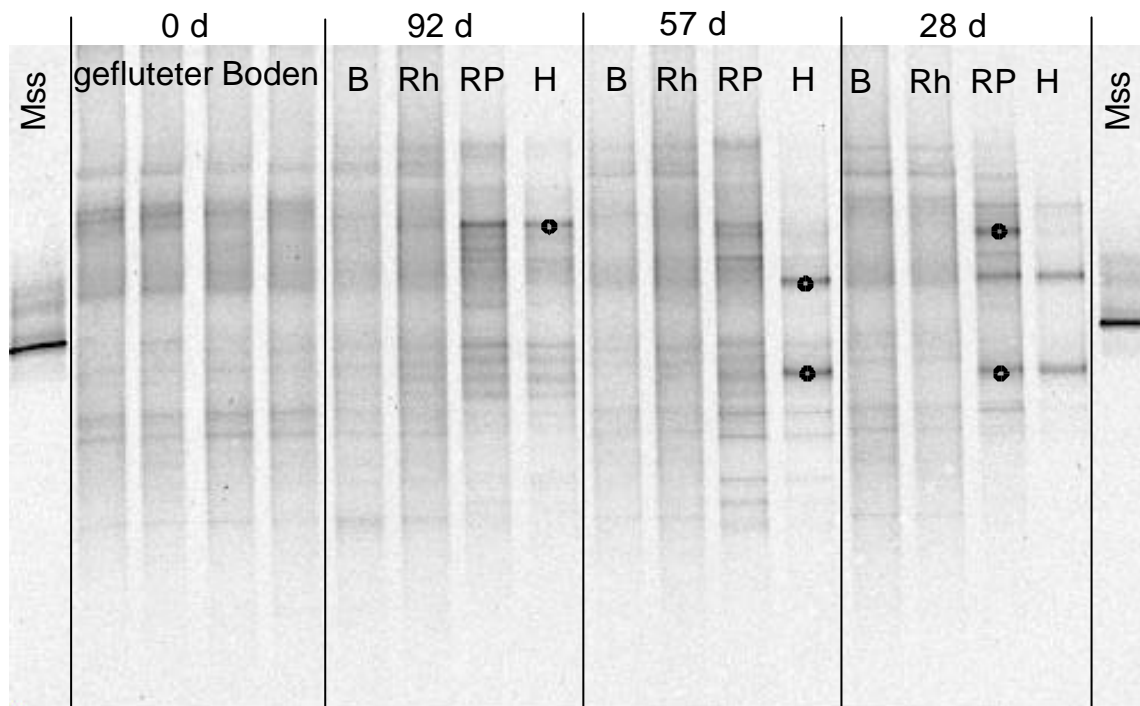
#### 4.2.6. Molekularbiologische Untersuchungen

Zur näheren Charakterisierung der Lebensgemeinschaft der Methanotrophen und ihrer Entwicklung in den verschiedenen Kompartimenten der Reismikrokosmen wurde aus Proben von verschiedenen alten Pflanzen die Gesamt-DNA extrahiert. Diese wurde in spezifischen PCRs amplifiziert und nach Auftrennung über denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) die Entwicklung der Bandenmuster in den Kompartimenten über die Vegetationsperiode verglichen. Interessante Banden, die z.B. eine zeitliche Änderung aufwiesen oder Hauptbanden der Probe waren, wurden sequenziert und phylogenetisch analysiert.

Um einen Überblick über die zeitlichen und räumlichen Änderungen im System Reispflanze/Boden zu erhalten, wurde die DNA aus zwei Nullproben und Proben der Kompartimente je eines 28, 57 und 92 Tage alten Mikrokosmos extrahiert. Am Beispiel der Nullproben wurde untersucht, ob die Aufnahme des Bodens in autoklaviertem Leitungswasser und die Verdünnung der so erhaltenen Bodensuspensionen zu einer Veränderung der molekularbiologischen Ergebnisse führt. Dazu wurden je zwei verschiedene Verdünnungen pro Nullprobe extrahiert. Diese Extraktionen wiesen keine Unterschiede in der Amplifizierbarkeit der DNA und in den über DGGE erhaltenen Bandenmustern auf. Die hier verwendete Methode der DNA-Extraktion ist daher als gut reproduzierbar anzusehen.

Die Versuche mit dem universellen Primerset zeigten, dass aus allen Proben amplifizierbare DNA gewonnen wurde. Die stärksten zeitlichen Änderungen der DGGE-Bandenmuster wurden nach Amplifikation mit dem universellen Primerset (16S rDNA, Domäne Bacteria) und dem 10γ-Primerset (16S rDNA, Ribulosemonophosphat-Weg Methylo trope, inklusive Typ I Methanotrophe) festgestellt.

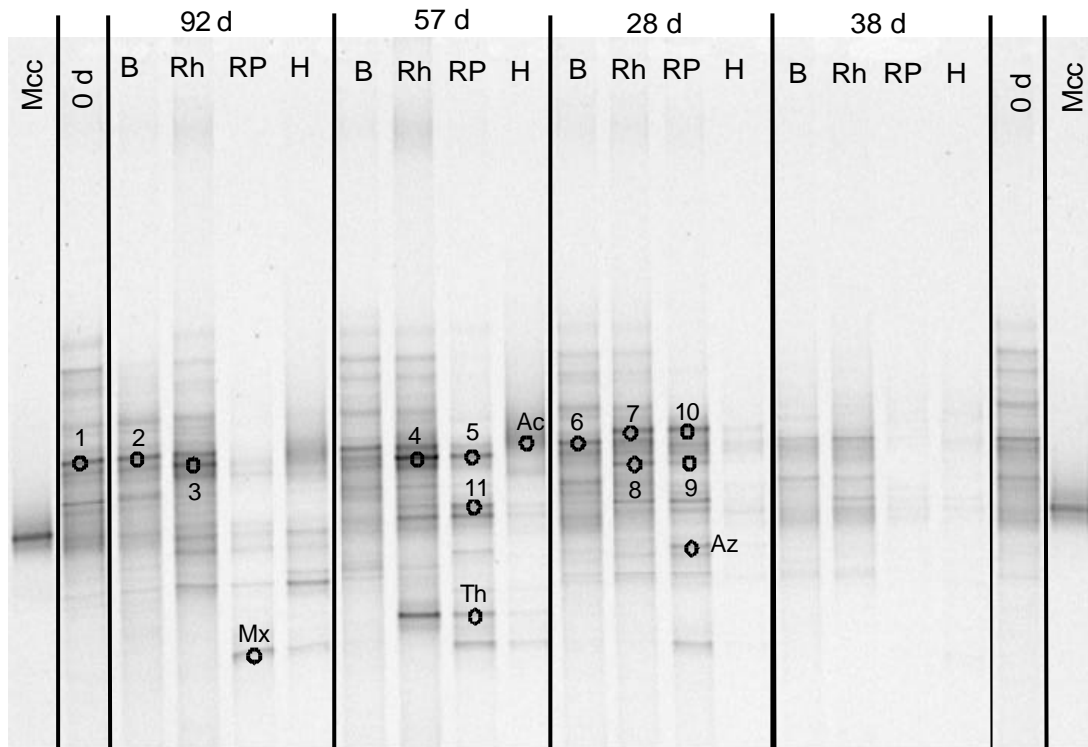
Mit dem universellen Primerset traten die Änderungen hauptsächlich in den Kompartimenten Rhizoplane und Homogenisat auf, wo die Anzahl der Banden mit zunehmendem Pflanzenalter anstieg (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: Änderung der DGGE-Bandenmuster verschiedener Mikrokosmenkompartimente nach Amplifikation der Gesamt-DNA mit dem universellen Primerset für eubakterielle DNA.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. Kreise markieren ausgestochene und sequenzierte Banden

Die Sequenzierung ausgewählter Banden zeigte, dass die in den Wurzelkompartimenten junger Pflanzen detektierten Hauptbanden Mitochondrien- bzw. Leucoplasten-DNA der Reispflanze zuzuordnen waren. Im Homogenisat 92 Tage alter Pflanzenwurzeln wurde eine Bande der Gruppe der Rhizobien zugeordnet. Keine der Banden zeigte Ähnlichkeit zu Sequenzen methanotropher Bakterien, die demnach unter den Eubakterien nicht dominant waren. Mit den spezifischen Primersets für methylorophe Bakterien konnten allerdings in allen Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode Methanotrophe nachgewiesen werden.

Die nach Amplifikation mit dem 10γ-Primerset erhaltenen DGGE-Bandenmuster zeigten zusätzlich zu Änderungen in den Wurzelkompartimenten auch Änderungen im durchwurzelten Boden. Da diese besonders deutlich zwischen den Nullproben und 28 bzw. 57 Tage alten Pflanzen sichtbar waren, wurde zusätzlich ein 38 Tage alter Mikrokosmos molekularbiologisch untersucht (Abbildung 4.10).



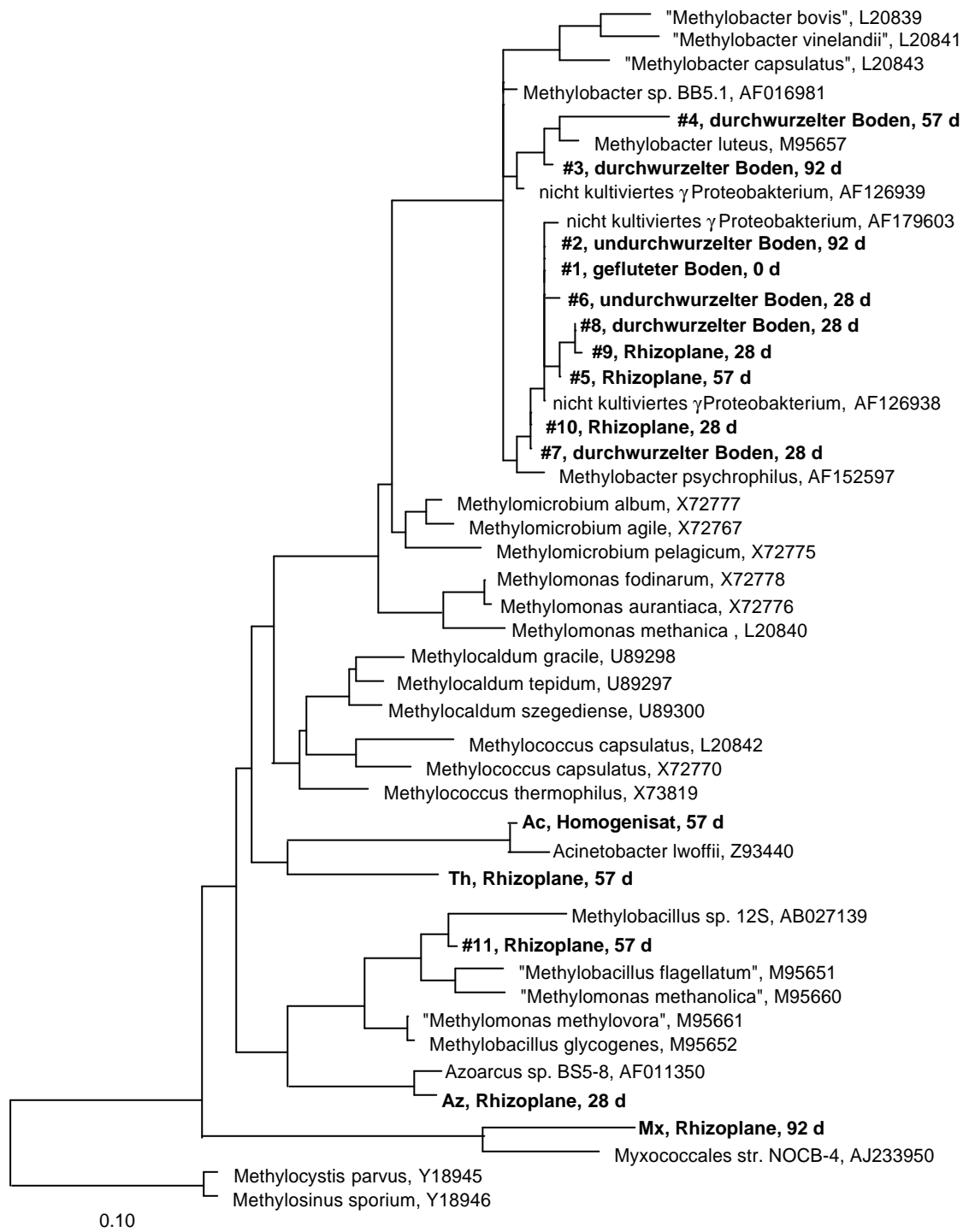
**Abbildung 4.10: Entwicklung der DGGE-Bandenmuster nach 10g-Amplifikation der Gesamt-DNA aus verschiedenen Mikrokosmoskompartimenten über die Vegetationsperiode von Reis.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mcc = *Methylococcus capsulatus*. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.11). Sequenzen der mit Abkürzungen markierten Banden wurden den folgenden Bakteriengruppen zugeordnet: Mx = *Myxococcales*, Th = *Thiotrix*, Ac = *Acinetobacter*, Az = *Azoarcus*

Das Bandenmuster des 38 Tage alten Mikrokosmos schien eine "Entwicklungsverbindung" zwischen den 28 und 57 Tage-Mustern zu ergeben. Es war allerdings sehr schwach, so dass eine eindeutige Aussage nicht möglich war.

Die Änderungen im Bandenmuster mit zunehmendem Pflanzenalter liessen eine Änderung der Populationsstruktur der RuMP-Weg Methyloprophen (inklusive Typ I Methanotrophe) vermuten. Die Sequenzierungen der in Abbildung 4.10 markierten Banden zeigte allerdings, dass die zu den Typ I Methanotrophen gehörenden Banden am besten übereinstimmten mit Sequenzen der Gattung *Methylobacter* (Abbildung 4.11). Es konnten also keine Änderungen in der Dominanz der verschiedenen Typ I Gattungen, sondern nur Verschiebungen innerhalb der Gattung

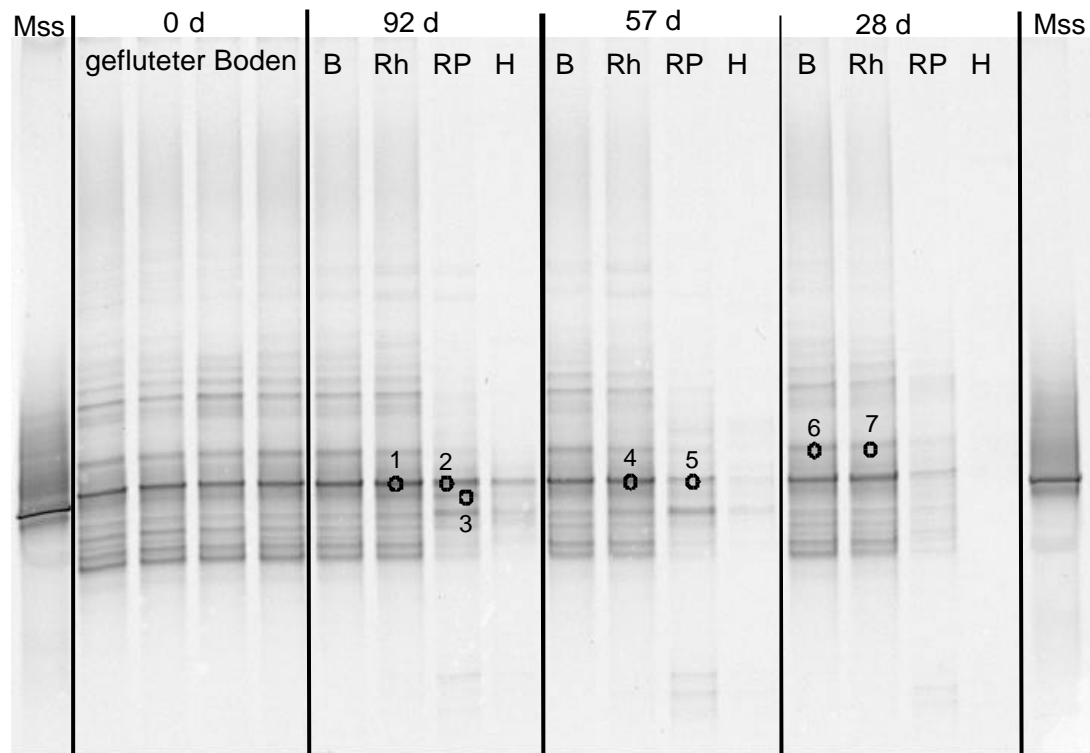
*Methylobacter* nachgewiesen werden. Verschiedene weitere Banden konnten den nicht-methylotrophen Bakteriengattungen *Acinetobacter* (Ac), *Azoarcus* (Az), *Myxococcales* (Mx) und *Thiotrix* (Th) zugeordnet werden (Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Aussage über die Populationsdynamik der RuMP-Weg Methylotrophen allein aus den DGGE-Bandenmustern nicht möglich ist.





**Abbildung 4.11: Phylogenetische Einordnung der DGGE-Banden-Sequenzen aus 10g-Amplifikationen von Mikrokosmenproben verschieden alter Reis-pflanzen.** Stammbaum berechnet über Neighbour-Joining. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.10, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reis-pflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registrierungsnummern der für die Stammbaum-berechnung verwendeten Sequenz aufgeführt. Abkürzungen: MOB = Methan oxidierende Bakterien, Rh = durchwurzelter Boden

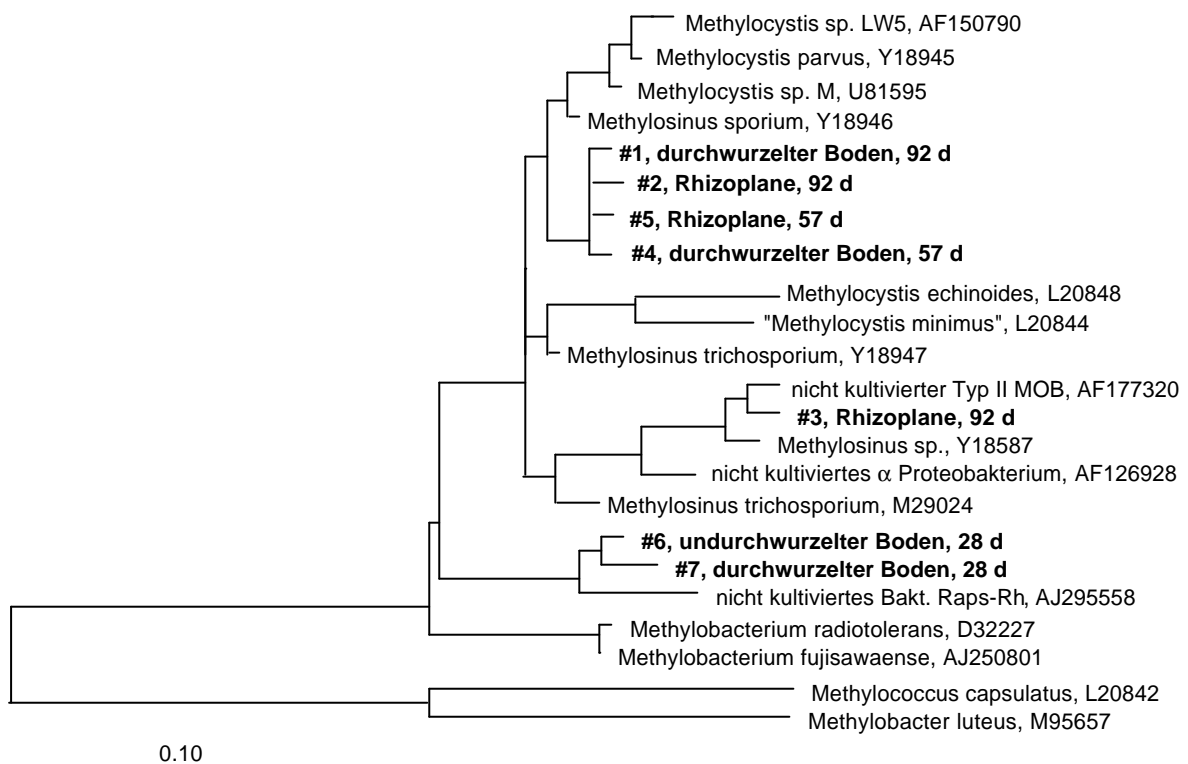
Die DGGE-Bandenmuster der 9 $\alpha$ -Amplifikationen ergaben ein zeitlich und zwischen den verschiedenen Kompartimenten konstantes Bild, einzige Ausnahme dabei war die Zunahme der Anzahl der Banden im Homogenisat. Damit wiesen die Bandenmuster auf eine stabile Population der Serin-Weg Methylo trophen (inklusive Typ II Methanotrophe) über die gesamte Vegetationsperiode und in allen Kompartimenten der Mikrokosmen hin (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12: DGGE-Bandenmuster nach 9 $\alpha$ -Amplifikation der DNA aus verschiedenen Mikrokosmos-Kompartimenten über die Vegetationsperiode von Reis.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.13).

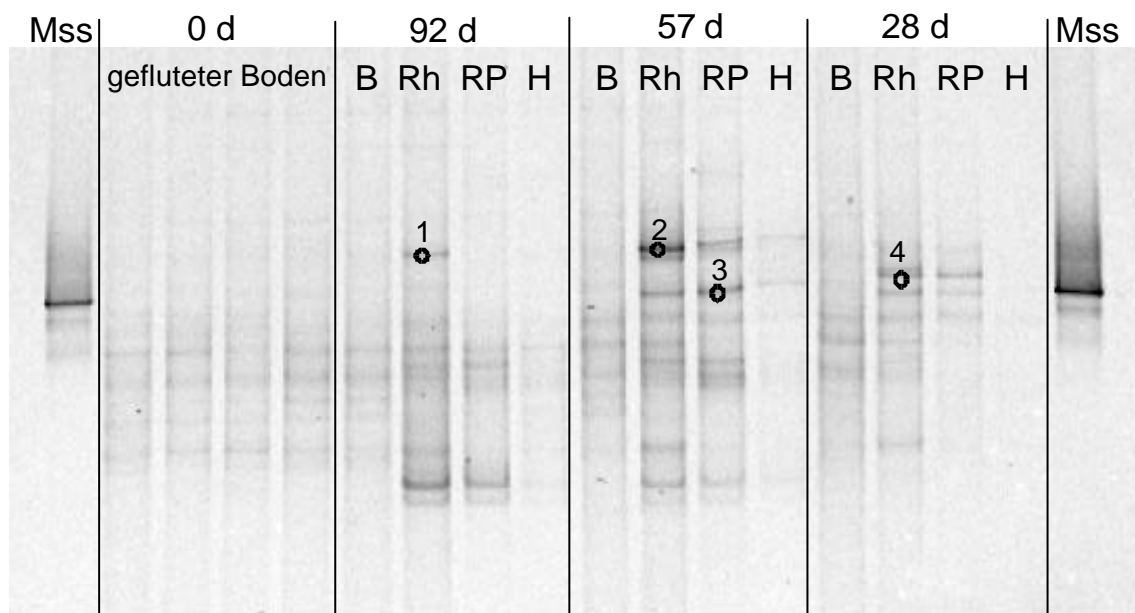
Die Hauptbande (Nr. 1, 2, 4, 5 in Abbildung 4.12) wurde aus verschiedenen DGGE-Bahnen ausgestochen und sequenziert. Die Sequenzen fielen nach phylogenetischer Analyse in die bekannten Gattungen der Typ II Methanotrophen *Methylosinus* und *Methylocystis* (Abbildung 4.13). Auch die Sequenz der schwachen Bande Nr. 3 in Abbildung 4.12 war der Gattung *Methylosinus* ähnlich. Nächstverwandte Sequenzen wurden von Henckel *et al.* (1999, Registrierungs-

nummer AF126928, AF126914) in Reisfeldboden und von Wise *et al.* (1999, AF177318, AF177320) in Boden von Mülldeponieabdeckungen gefunden. Schwächere Banden mit geringerer elektrophoretischer Mobilität (Nr. 6 und 7 in Abbildung 4.12) wurden einer Gattung methylotropher Bakterien, *Methylobacterium*, zugeordnet. Diese Sequenzen zeigten höchste Übereinstimmung zu Sequenzen aus Reisfeldboden (Henckel *et al.* 2000, AF283225) und von Raps durchwurzeltem Boden (O. Kaiser, A. Pühler and W. Selbitschka 2000, unveröffentlicht, AJ295558, EMBL Datenbank).



**Abbildung 4.13: Phylogenetische Einordnung der Sequenzen von DGGE-Banden nach 9a-Amplifikation der DNA aus Mikrokosmenproben verschieden alter Reispflanzen.** Stammbaum berechnet über Neighbour-Joining. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.12, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reispflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registrierungsnummern der für die Stammbaumberechnung verwendeten Sequenz aufgeführt. Abkürzungen: MOB = Methan oxidierende Bakterien, Rh = durchwurzelter Boden

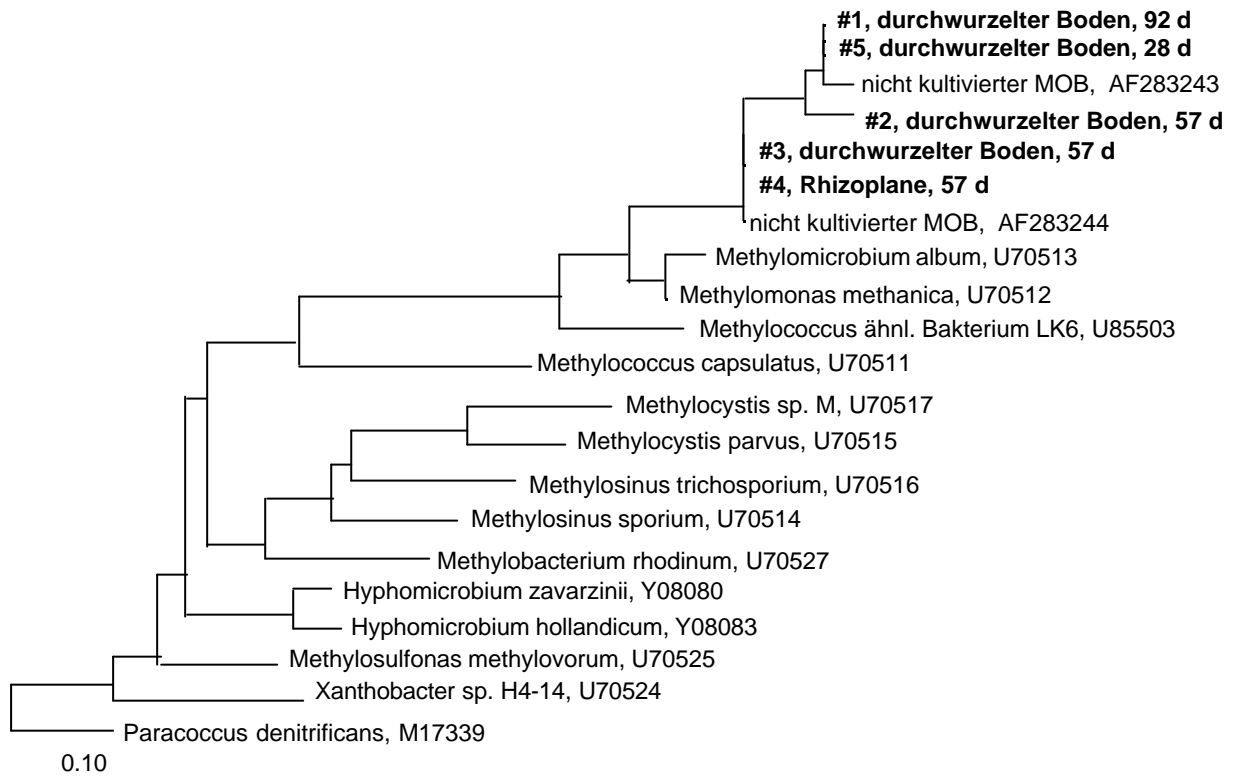
Die Amplifikationen des funktionellen Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der Methanoldehydrogenase (*mxoF*) ergaben starke Unterschiede in der Menge des PCR-Produkts in den verschiedenen Mikrokosmoskompartimenten. Diese können auf die unterschiedliche Anzahl der vorhandenen Zielsequenzen im DNA-Extrakt zurückgeführt werden (Henckel *et al.* 1999). Die stärksten Amplifikationsprodukte der Methanol-Dehydrogenase wurden für den durchwurzelten Boden 57 und 92 Tage alter Reispflanzen erhalten, gefolgt von den Rhizoplaneextrakten dieser Altersstufen. Die geringsten Mengen Amplifikationsprodukt traten in den Homogenisatextrakten auf, in der Reihenfolge 28 d < 57 d < 92 d. Auch im undurchwurzelten Boden wurden nur geringe Mengen PCR-Produkt erhalten, so dass es bei ihrer Auftrennung über DGGE nicht zur Ausbildung eines deutlichen Bandenmusters kam und die erhaltenen schwachen Banden nicht sequenziert werden konnten (Abbildung 4.14). Die höheren Mengen an Amplifikationsprodukt in den durch die Wurzel beeinflussten Kompartimenten verdeutlichten - wie schon die Zellzahlbestimmungen - den positiven Einfluss der Reiswurzeln auf das Wachstum der Methanotrophen.



**Abbildung 4.14: DGGE-Bandenmuster der *mxoF*-Amplifikationsprodukte aus Mikrokosmenproben über die Vegetationsperiode von Reis.**

d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.15).

Die aus den Kompartimenten durchwurzelter Boden und Rhizoplane erhaltenen Sequenzen zeigten höchste Übereinstimmung zu anderen Sequenzen aus Reisfeldboden (Henckel *et al.* 2000, AF283243, AF283244) und fielen in die Gruppe der Typ I Methanotrophen (Abbildung 4.15).



**Abbildung 4.15: Phylogenetische Einordnung der aus *mxoF*-DGGE erhaltenen Sequenzen aus Mikrokosmenproben.** Stammbaum berechnet über Maximum-Parsimony. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.14, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reispflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registrierungsnummern der für die Stammbaumberechnung verwendeten Sequenz aufgeführt. MOB = Methan oxidierende Bakterien.

Viele der ausgestochenen Einzelbanden der ursprünglichen DGGE-Gele spalteten sich nach Reamplifikation in Mehrfachbanden auf und konnten daher nicht sequenziert werden. Die Sequenzierung von nur fünf Banden lässt keine Aussage über die Diversität der Population der Methan oxidierenden Bakterien zu, hebt aber die Bedeutung der Typ I Methanotrophen im durchwurzelter Boden und auf

der Reisswurzel hervor.

#### **4.2.7. Ganzzellhybridisierungen mit familienspezifischen Sonden für Typ I und Typ II Methanotrophe (FISH)**

Zur *in-situ* Detektion einzelner Zellen der beiden Familien der Methanotrophen wurden sechs Sonden für Typ I und drei Sonden für Typ II neu formuliert und mit Reinkulturen getestet. Die Entwicklung dieser Sonden und die Anpassung der Bedingungen in der "Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung" (FISH) für die Detektion der beiden Familien der Methanotrophen ist im Anhang unter "Group specific, 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation" ausführlich dargestellt. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der spezifischen Sonden für Typ I und Typ II Methanotrophe erstmalig die numerische Dominanz der beiden Familien in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden. Die geringe Zellzahl der Methan oxidierenden Bakterien im Vergleich zur Gesamtzellzahl erschwerte allerdings die quantitative Auswertung. Daher wurden die Zellzahlen der Methanotrophen als prozentuale Anteile an der detektierten Gesamtzellzahl angegeben und nicht auf das Trockengewicht der untersuchten Probe hochgerechnet. Die prozentualen Anteile an der Gesamtzellzahl schwankten für die Summe beider Familien der Methanotrophen von 0,5 bis 0,9 % in den Bodenkompartmenten und waren nur im gefluteten Boden zur Zeit der Aussaat mit 3,4 % deutlich höher (Tabelle 4.4). Die Rhizoplane zeigte mit Werten von 1,3 bis 4,9 % höhere relative Anteile der Methanotrophen an der Gesamtzellzahl als die Bodenkompimente und auch im Homogenisat wurden bei 92 Tage alten Pflanzen Anteile von 1,4 % detektiert.

Betrachtet man die Anzahl positiver Zellen der beiden Familien getrennt so wird deutlich, dass tendenziell die Typ II Methanotrophen in allen Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode von Reis dominant waren. Trotz ihrer geringen Zellzahl konnten Typ I Methanotrophe in allen Kompartimenten und über die gesamte Saison nachgewiesen werden. In der Rhizoplane erreichten die Typ I Zellen sogar 50 bis 70 % der detektierten methanotrophen Gesamtpopulation. Dies zeigt die Bedeutung der Reisswurzeln für das Wachstum der Methan oxidierenden Bakterien und den Erhalt ihrer Diversität.

Die hohen relativen Anteile der Methanotrophen im gefluteten Boden vor dem

Auspflanzen der Reispflanzen verdeutlichten die Überdauerungsfähigkeit dieser Bakterien unter ungünstigen Umweltbedingungen wie z.B. Austrocknung des Bodens und Methanmangel. Diese Überdauerungsfähigkeit könnte z.B. auf die Ausbildung von Dauerstadien zurückzuführen sein.

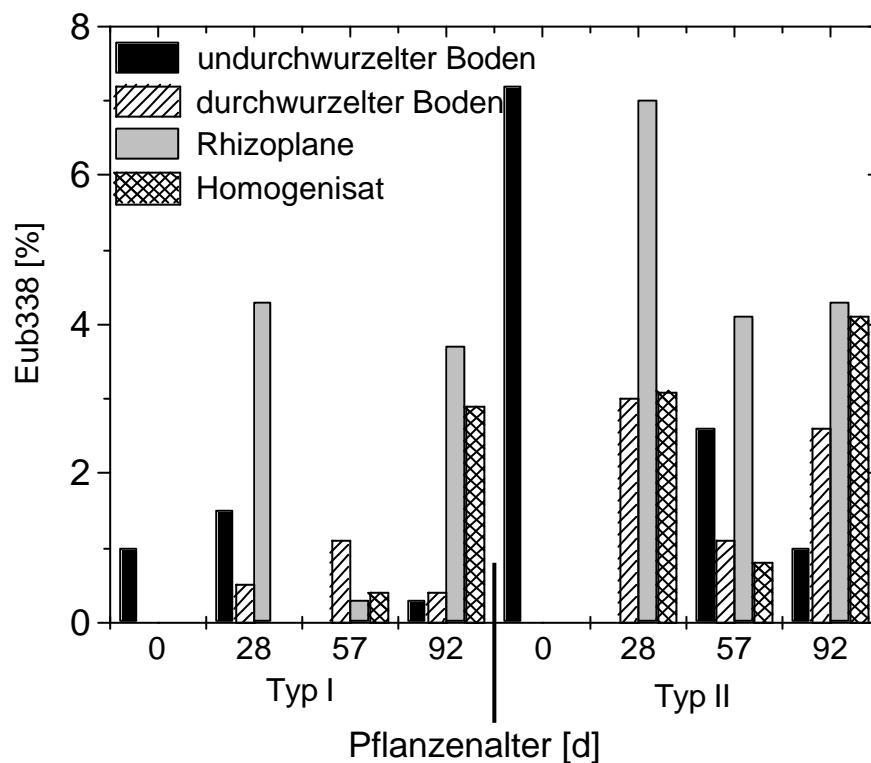
**Tabelle 4.4: Relativer Anteil von Methan oxidierenden Bakterien und Eubakterien an der Gesamtzellzahl (DAPI) über die Vegetationsperiode von Reis in den verschiedenen Kompartimenten der Mikrokosmen.**

Angegeben sind die ausgezählten Gesamtzellzahlen der Proben (DAPI, n) sowie die relativen prozentualen Anteile der Zellen, die mit den entsprechenden Sonden ein Signal ergaben.

Signal	Pflanzen- alter [d]	undurchwur- zelter Boden	durchwurzel- ter Boden	Rhizoplane	Homogenisat
<b>DAPI</b>	0	n = 697			
<b>Eub 338<sup>1</sup></b>		41,9 %			
<b>Ma 450<sup>2</sup></b>		3,0 %			
<b>Mg 84 + 705<sup>3</sup></b>		0,4 %			
<b>DAPI</b>	28	n = 405	n = 770	n = 596	n = 499
<b>Eub 338</b>		33,1 %	25,6 %	43,3 %	13,0 %
<b>Ma 450</b>		<0,3 %	0,8 %	3,0 %	0,4 %
<b>Mg 84 + 705</b>		0,5 %	0,1 %	1,9 %	<0,2 %
<b>DAPI</b>	57	n = 637	n = 811	n = 1196	n = 1150
<b>Eub 338</b>		24,0 %	22 %	28,3 %	21,8 %
<b>Ma 450</b>		0,6 %	0,3 %	1,2 %	0,2 %
<b>Mg 84 + 705</b>		<0,2 %	0,3 %	0,1 %	0,1 %
<b>DAPI</b>	92	n = 763	n = 1085	n = 898	n = 902
<b>Eub 338</b>		37,5 %	25,2 %	33,3 %	19,1 %
<b>Ma 450</b>		0,4 %	0,7 %	1,5 %	0,8 %
<b>Mg 84 + 705</b>		0,1 %	0,1 %	1,2 %	0,6 %

<sup>1</sup> Eub338: Sonde für die gesamte Gruppe der Eubakterien (Amann 1990), <sup>2</sup> Mα450: Für Typ II Methanotrophe spezifische Sonde (Eller *et al.* 2000), <sup>3</sup> Mγ84 + 705: Für Typ I Methanotrophe spezifische Sondenkombination (Eller *et al.* 2000)

Zusätzlich zum Vergleich der Gesamtzahl der DAPI positiven Zellen mit der Anzahl der mit den Sonden M $\alpha$ 450 oder M $\gamma$ 84/705 nachgewiesenen Zellen wurde auch ein Vergleich zur Anzahl der eubakteriellen Zellen durchgeführt. Der Nachweis der Eubakterien erfolgte wie der Nachweis der Methanotrophen durch eine Hybridisierung (FISH). Im Gegensatz dazu wurde die Gesamtzahl der Zellen mit Hilfe einer DNA-Färbung mit DAPI bestimmt. Dieser Farbstoff bindet an jede Form von DNA, unabhängig von ihrer Herkunft (Pflanze, Bakterium) und vom Aktivitätszustand der Zelle (z.B. vegetative Zellform oder Dauerstadium). Um zu überprüfen, ob der Vergleich DAPI/Sondensignal auch in Proben mit Pflanzenmaterial zulässig ist, wurde auch der relative Anteil der Methanotrophen an der Anzahl der Eubakterien berechnet (Abbildung 4.16). Die mit dieser Berechnung erhaltenen Ergebnisse waren qualitativ mit den über die Gesamtzellzahl berechneten Werten vergleichbar.



**Abbildung 4.16:** Entwicklung der relativen Anzahl der mit FISH nachgewiesenen Typ I und Typ II Methanotrophen in den verschiedenen Kompartimenten der Mikrokosmen über die Vegetationsperiode. Die Angaben beziehen sich auf die Anzahl der mit der universellen Eubakteriensonde Eub338 nachgewiesenen Zellen.

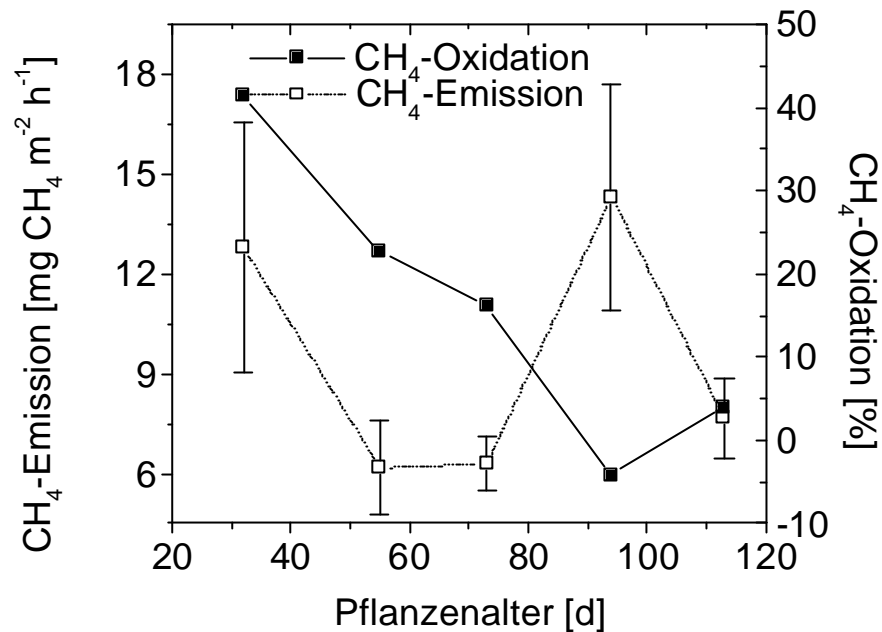


### **4.3. Feldversuch zur Populationsdynamik von Methan oxidierenden Bakterien**

Vergleichbare Versuche wie im vorigen Abschnitt für das Modellsystem Mikrokosmos dargestellt, wurden während der Saison 1999 in einem Reisfeld in Vercelli, Norditalien, durchgeführt. Diese dienten der Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Modellsystem Mikrokosmos in das Agrarökosystem Reisfeld. Die Daten zur *in-situ* Aktivität und potentiellen Methanoxidation wurden in Zusammenarbeit mit M. Krüger erhoben (Krüger 2000).

#### **4.3.1. Änderung der Methanemission und in-situ Methanoxidation über die Saison**

Die Methanemissionen waren im Feldexperiment mit Werten zwischen 5 und 15 mg CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> um etwa 20 % geringer als die im Mikrosomenexperiment bestimmten Emissionen (Abbildung 4.17). Im Feld wurden zwei Emissionsmaxima gemessen: zu Beginn der Saison und 80 Tage nach dem Auspflanzen. Im Gegensatz dazu wurde im Mikrokosmenexperiment nur ein Maximum zu Beginn der reproduktiven Wachstumsphase der Pflanzen gemessen. Bezogen auf das Emissionsmaximum zur Zeit der Blüteperiode der Pflanzen (Feld: 80 Tage alte Pflanzen, Mikrokosmen: ca. 60 Tage alte Pflanzen) wurde im Feld- und Mikrokosmenexperiment ein ähnlicher zeitlicher Verlauf festgestellt. Das im Feld nachgewiesene erste Emissionsmaximum kann auf den Abbau von Stroh zurückgeführt werden, der im Mikrokosmos durch die Verwendung strohfreien Bodens nicht auftritt.



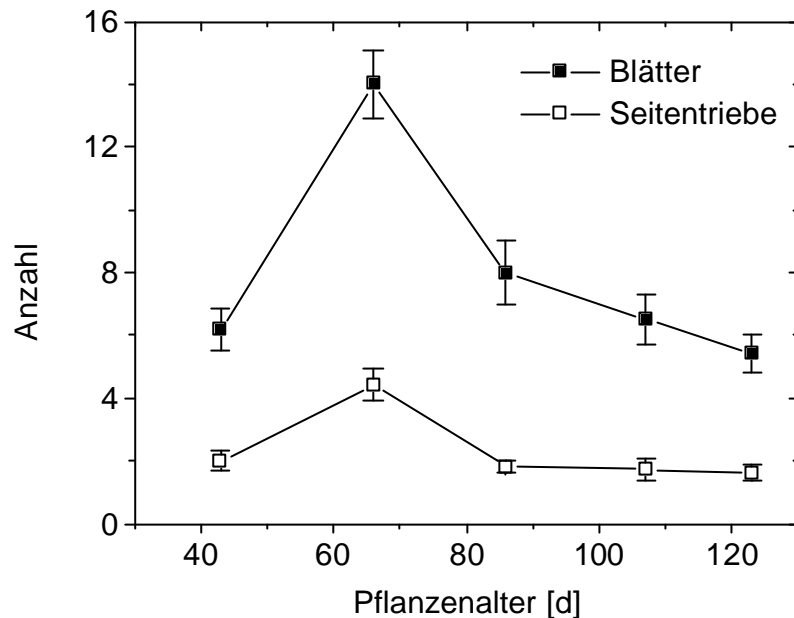
**Abbildung 4.17: Methanemission und *in-situ* Methanoxidation über die Vegetationsperiode der Reispflanzen im Feld, Saison 1999.** Mittelwert  $\pm$  SF ( $n = 3 - 5$ ). Der Anteil der *in-situ* Oxidation wurde aus der Differenz der Methanemissionen mit und ohne Inhibitor der Methanoxidation  $\text{CH}_2\text{F}_2$  berechnet (Kapitel 3.4.2) (aus: Krüger 2000)

Die Flussmessungen im Reisfeld bestätigten den bereits im Mikrokosmenexperiment gefundenen, nur kurzzeitigen Einfluss der *in-situ* Methanoxidation auf die Methanemission (Abbildung 4.17). Die *in-situ* Methanoxidation ging von etwa 40 % zu Beginn der Wachstumsperiode der Reispflanzen auf Werte um 0 % bei etwa 80 Tage alten Pflanzen zurück und blieb anschliessend bis zum Ende der Saison vernachlässigbar. Wie im Mikrokosmenexperiment verlief auch im Feldversuch der Rückgang der *in-situ* Methanoxidation parallel zum Wechsel der Pflanzen von vegetativer zu reproduktiver Wachstumsphase.

#### 4.3.2. Änderung der Biomasse der Reispflanzen über die Saison 1999

Die Entwicklung der Biomasse der Reispflanze wurde im Feldversuch anhand verschiedener Parameter verfolgt. Während die Anzahl der Blätter und Seitentriebe einen Maximalwert nach ca. 70 Tagen Wachstum erreichte (Abbildung 4.18) nahm die Biomasse der Wurzeln und Sprosse während der gesamten Saison zu (Tabelle 4.5). Der Beginn der Blütenbildung wurde nach ca.

70 Tagen Wachstum beobachtet. Dies stimmte gut mit dem Rückgang der Anzahl der Blätter pro Pflanze überein, der damit den Übergang der Pflanzen von der vegetativen in die reproduktive Wachstumsphase markierte.



**Abbildung 4.18: Entwicklung der Reispflanzen über die Saison 1999, dargestellt anhand der mittleren Anzahl Blätter und Seitentriebe pro Pflanze. Mittelwert  $\pm$  SF (n = 5)**

**Tabelle 4.5: Änderung der Pflanzenbiomasse während der Saison 1999.**

„Spross“ bezeichnet hier den gesamten oberirdischen Teil der Pflanze, inklusive Rispen. „Höhe“ bezeichnet die Gesamthöhe der Pflanzen. Mittelwert  $\pm$  SF (n = 8–10)

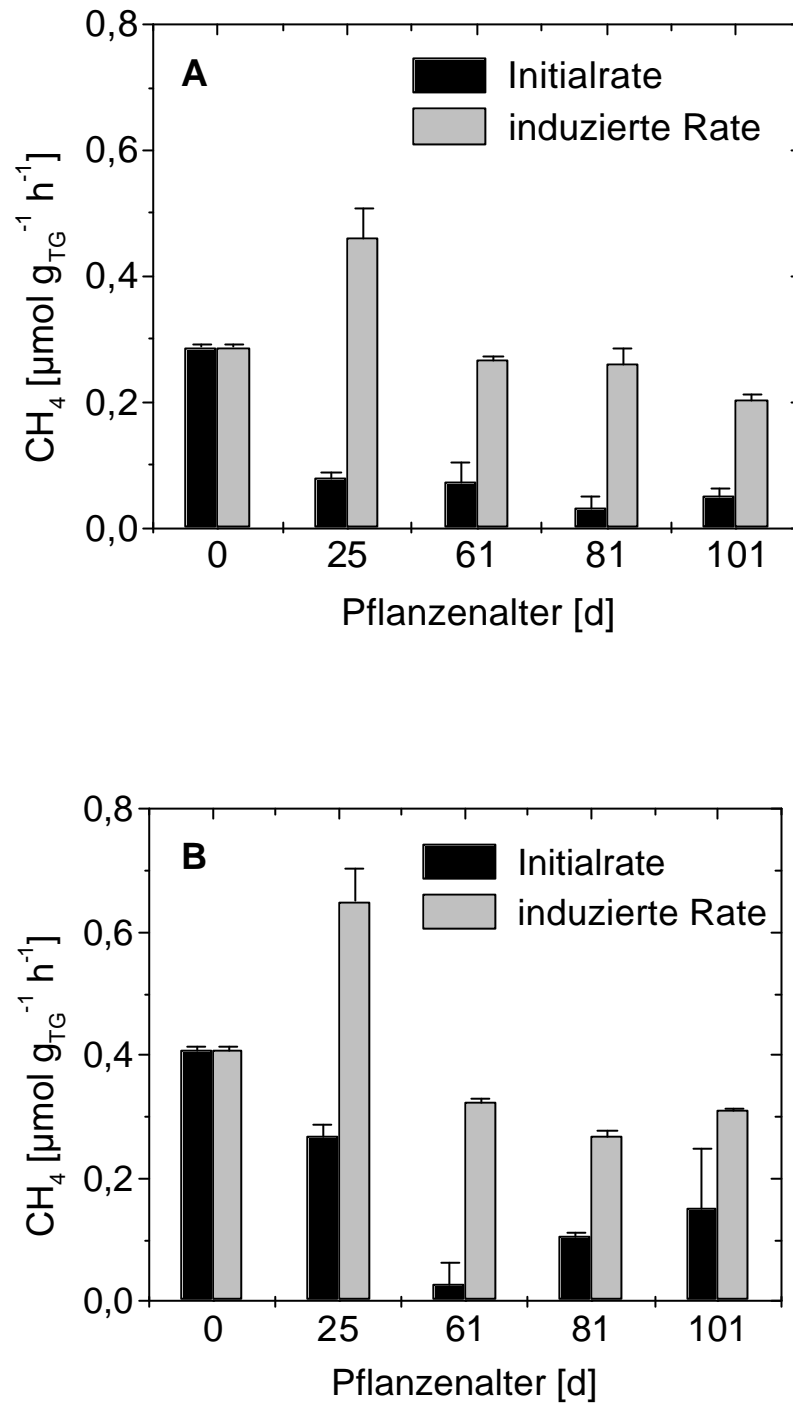
Pflanzenalter [d]	Spross [g <sub>TG</sub> ]	Wurzel [g <sub>TG</sub> ]	Höhe [cm]
33	0,17 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	30,5 $\pm$ 0,70
56	1,39 $\pm$ 0,15	0,43 $\pm$ 0,05	46,0 $\pm$ 1,80
76	1,97 $\pm$ 0,2	0,37 $\pm$ 0,13	65,3 $\pm$ 1,30
97	4,09 $\pm$ 0,56	0,53 $\pm$ 0,09	104,3 $\pm$ 1,26
113	8,44 $\pm$ 1,61	1,25 $\pm$ 0,5	106,3 $\pm$ 0,86

Die Zunahme der Masse der oberirdischen Pflanzenteile ist auf die Bildung der Reproduktionsorgane und die Ausbildung von Samen zurückzuführen. Zum Ende der Saison nahm die Gesamtwurzelmasse wieder zu. Dies konnte auf ein verstärktes Wachstum in den tieferen Bodenschichten zurückgeführt werden (Krüger 2000).

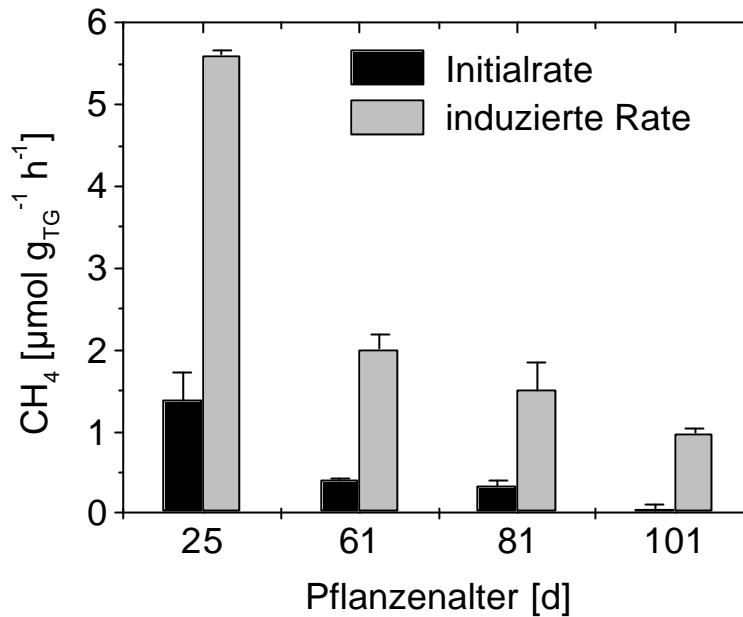
#### 4.3.3. Potentielle Methanoxidationsraten im Feldexperiment

Messungen der potentiellen Methanoxidation an Feldproben ergaben für den undurchwurzelter Boden deutlich geringere **Initialraten** der Methanoxidation als für den durchwurzelter Boden (Abbildung 4.19 A und B). Im undurchwurzelter Boden (Abbildung 4.19 A) nahmen die Initialraten von Maximalwerten ( $0,29 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) zu Beginn des Pflanzenwachstums im Verlauf der Saison kontinuierlich auf Werte um  $0,05 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 100 Tage alten Pflanzen ab. Auch die Initialrate im durchwurzelter Boden fiel zunächst von  $0,4 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  zu Beginn des Pflanzenwachstums auf  $0,03 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 60 Tage alten Pflanzen ab. Diese stieg allerdings zum Ende der Saison wieder auf Werte von  $0,15 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  an (Abbildung 4.19 B). Die Initialraten der Bodenkompimente lagen über die Saison gesehen in den Feldproben höher als im Mikrokosmenexperiment.

Die Initialraten der Wurzeln waren bei jungen Pflanzen im Feldversuch mit  $6,6 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  ca. 3,5-fach höher als im Mikrokosmenexperiment (Abbildung 4.20), fielen im Verlauf der Saison allerdings auf Werte der Größenordnung des Mikrokosmenexperiments ab. Der stetige Rückgang der an den Wurzeln gemessenen Initialraten spiegelte sowohl im Feldversuch als auch im Mikrokosmenexperiment den Rückgang der *in-situ* Methanoxidation wider.



**Abbildung 4.29: Entwicklung der potentiellen Methanoxidationsraten in Bodensuspensionen aus einem Reisfeld (Vercelli) über die Saison 1999 mit (A) undurchwurzeltem Boden, (B) durchwurzeltem Boden. Mittelwert  $\pm$  SF (n = 3). Initialrate: Methanoxidation vom Beginn der Messung bis zum Einsetzen der schnellen (induzierten) Methanoxidation.**



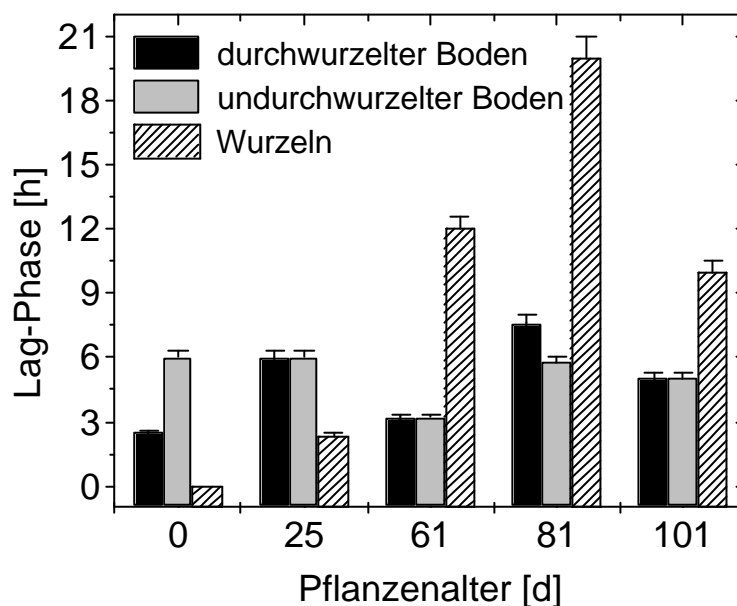
**Abbildung 4.20: Entwicklung der potentiellen Methanoxidationsraten an Wurzeln von Reispflanzen aus einem Feld in Vercelli über die Saison 1999. Mittelwert  $\pm$  SF (n = 3)**

Im Gegensatz zu den Initialraten wiesen die **induzierten Raten** im undurchwurzelten Boden ein Maximum von  $0,45 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 25 Tage alten Pflanzen auf, lagen aber in der übrigen Saison relativ konstant bei Werten um  $0,2 - 0,3 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Abbildung 4.19 A). Auch im durchwurzelten Boden wurde ein Maximum der induzierten Raten von  $0,65 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  bei 25 Tage alten Pflanzen gemessen. Während der restlichen Saison blieben sie auch in diesem Kompartiment konstant bei Werten von  $0,3$  bis  $0,4 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Abbildung 4.19 B). Die induzierten Raten in den Bodenkompartmenten des Feldes lagen etwa in der gleichen Größenordnung wie die im Mikrokosmenexperiment bestimmten Raten. Die induzierten Raten an den Wurzeln nahmen parallel zu den Initialraten kontinuierlich über die Saison von  $5,5 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  auf  $1 \mu\text{mol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$  ab (Abbildung 4.20). Diese Abnahme der potentiellen Oxidationsraten an Wurzeln über die Saison bestätigte den im Mikrosomenexperiment gefundenen Trend.

Die an den Feldproben gemessenen **Lag-Phasen** waren deutlich kürzer als die im Mikrokosmenexperiment gemessenen Werte (Tabelle 4.2). Im undurchwurzelten Boden des Felds waren sie mit  $3 - 7,5 \text{ h}$  nur etwa ein Sechstel bis ein Drittel so lang wie im undurchwurzelten Boden der Mikrokosmen. Ähnlich gross war der

Unterschied zwischen den beiden Experimenten für die an den Wurzeln gemessenen Lag-Phasen: Im Feldversuch betrug diese mit 2 – 20 h nur ein Fünftel der im Mikrokosmenexperiment bestimmten Werte. Die Entwicklung der Lag-Phasen in den verschiedenen Kompartimenten über die Vegetationsperiode von Reis waren allerdings in beiden Experimenten vergleichbar. Die Lag-Phasen der Bodenkompimente blieben relativ konstant, während für die Wurzeln eine Zunahme der Lag-Phase mit zunehmendem Pflanzenalter beobachtet wurde.

Im Feldversuch unterschieden sich die Lag-Phasen der beiden Bodenkompimente – im Gegensatz zum Mikrokosmenexperiment - kaum voneinander. Dies konnte auf eine weniger strikte Trennung von durchwurzelterm und undurchwurzelterm Boden im Feld zurückgeführt werden.



**Abbildung 4.21: Lag-Phasen der potentiellen Methanoxidation in Feldproben aus einem Reisfeld in Vercelli über die Saison 1999.** Mittelwert  $\pm$  prozentualer Fehler ( $n = 3$ )

#### 4.3.4. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien über die Saison 1999

Im Gegensatz zum Mikrokosmenexperiment wurde im Feld die deutlichste Änderung der Zellzahl nicht in der Rhizoplane, sondern im Homogenisat

gefunden. In diesem Kompartiment wurde eine Zunahme von  $3,26 \times 10^6 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei 20 Tage alten Pflanzen auf  $2,9 \times 10^7 \text{ g}_{\text{TG}}^{-1}$  bei 60 Tage alten Pflanzen beobachtet (Tabelle 4.6). Auch im Feld entwickelten sich die Zellzahlen im Homogenisat und auf der Rhizoplane parallel, wobei aber die Zellzahlen im Homogenisat stärker zunahmen als auf der Rhizoplane.

**Tabelle 4.6: Entwicklung der Zellzahlen der Methan oxidierenden Bakterien in Boden- und Wurzelproben aus einem Reisfeld in Vercelli über die Saison 1999.** Die Zellzahlen wurden über MPN bestimmt (Kapitel 3.4.6). **Fett:** Mittelwert  $\pm$  SF ( $n = 3$ ), normal: Werte eines Mikrokosmos'  $\pm$  Standardabweichung der 8 parallelen Verdünnungen. "Trockener Boden" bezeichnet eine vor dem Fluten des Feldes entnommene Bodenprobe, in der Ober- (später durchwurzelt) und Unterboden (später undurchwurzelt) durchmischt wurden. Zum Pflanzenalter "0 d" wurde aus dem gefluteten Feld eine Bodenprobe entnommen, die in Ober- und Unterboden getrennt untersucht wurde.

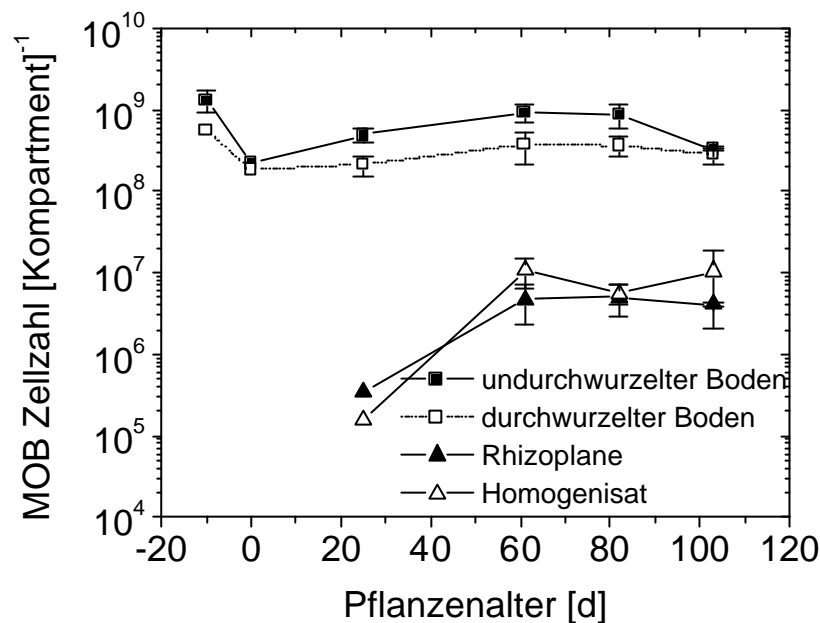
<b>Pflanzen- alter [d]</b>	<b>Undurchwurzelter Boden <math>\cdot 10^5 [\text{g}_{\text{TG}}^{-1}]</math></b>	<b>Durchwurzelter Boden <math>\cdot 10^5 [\text{g}_{\text{TG}}^{-1}]</math></b>	<b>Rhizoplane <math>\cdot 10^5 [\text{g}_{\text{TG}}^{-1}]</math></b>	<b>Homogenisat <math>\cdot 10^5 [\text{g}_{\text{TG}}^{-1}]</math></b>
trockener Boden	$34 \pm 10$			
0	$5,5 \pm 2,7$	$11 \pm 1,4$		
<b>25</b>	<b><math>12,6 \pm 2,5</math></b>	<b><math>12,8 \pm 3,6</math></b>	$73 \pm 12$	$32,6 \pm 5,9$
<b>61</b>	<b><math>23,7 \pm 5,8</math></b>	<b><math>22,4 \pm 9,4</math></b>	<b><math>129 \pm 66</math></b>	<b><math>289 \pm 120</math></b>
<b>81</b>	<b><math>22,7 \pm 7,8</math></b>	<b><math>21,8 \pm 6,0</math></b>	<b><math>95 \pm 39</math></b>	<b><math>105 \pm 27</math></b>
<b>100</b>	<b><math>8,32 \pm 0,2</math></b>	<b><math>16,9 \pm 4,4</math></b>	<b><math>45,4 \pm 2,0</math></b>	<b><math>118 \pm 95</math></b>

In den Bodenkompartmenten kam es nur zu einer geringen Zunahme der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien. Hier traten im Gegensatz zu den Mikrokosmen keine deutlichen Unterschiede zwischen den im undurchwurzelter und im durchwurzelter Boden detektierten Zellzahlen auf. Der positive Einfluss der Reisswurzeln auf den sie umgebenden Boden war demnach bezüglich der Zellzahlen im Feldversuch weniger ausgeprägt, konnte aber anhand der



potentiellen Methanoxidationsraten in den Bodensuspensionen nachgewiesen werden (Kapitel 4.3.3).

Die Berechnung der Zellzahlen der Methanotrophen für die Gesamtmasse des jeweiligen Kompartiments ergab auch im Feldexperiment die höchsten Gesamtzahlen in den Bodenkompartmenten (Abbildung 4.22).

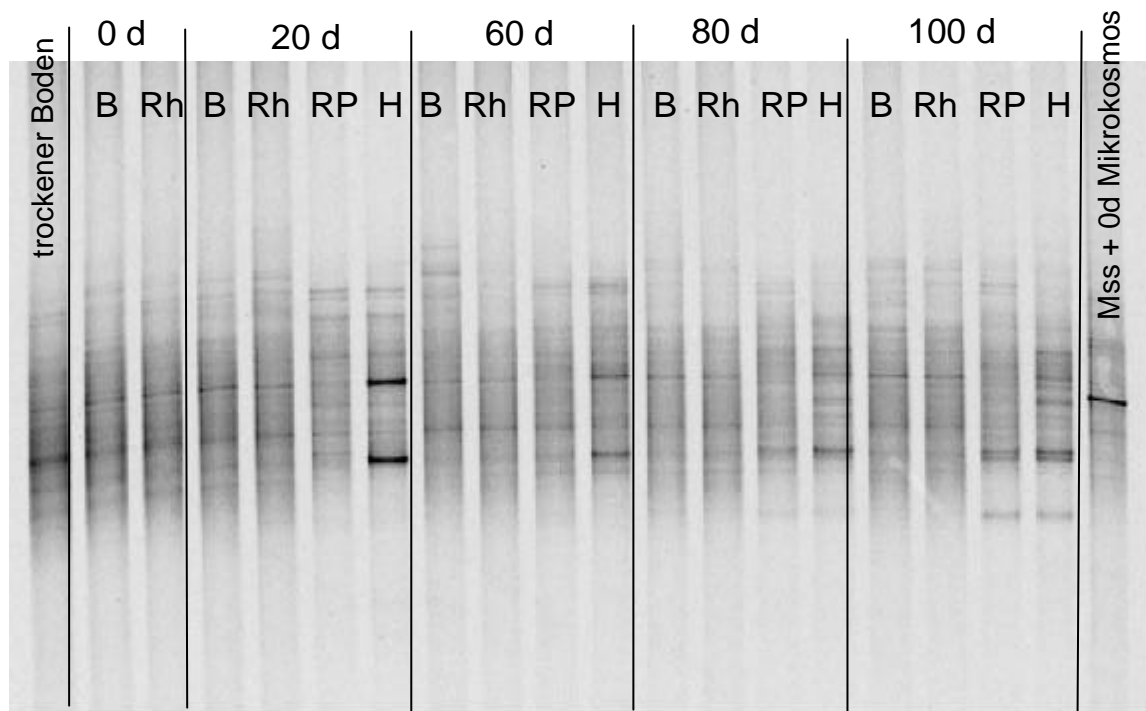


**Abbildung 4.22: Entwicklung der Gesamtzellzahl Methan oxidierender Bakterien in Boden- und Wurzelkompartimenten eines Reisfeldes während der Saison 1999. Mittelwert  $\pm$  SF (n = 1 - 3)**

#### 4.3.5. Molekularbiologische Untersuchungen an Reisfeldproben

Um einen direkten Vergleich der Populationen und ihrer Entwicklung im Mikrosomen- und im Feldexperiment zu ermöglichen, wurden die im Mikrosomenexperiment verwendeten molekularbiologischen Methoden auch auf die Feldproben angewandt. Die Gesamt-DNA wurde aus Proben verschieden alter Pflanzen (Nullproben, 25, 61, 81, 100 Tage) extrahiert und mit den Primersets universell, 9 $\alpha$  (Serin-Weg Methylo trope, inklusive Typ II Methanotrophe), 10 $\gamma$  (RuMP-Weg Methylo trope, inklusive Typ I Methanotrophe) und mxaF ( $\alpha$ -Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase, in allen Methylo trophen vorhanden) amplifiziert (Kapitel 3.4.8.4).

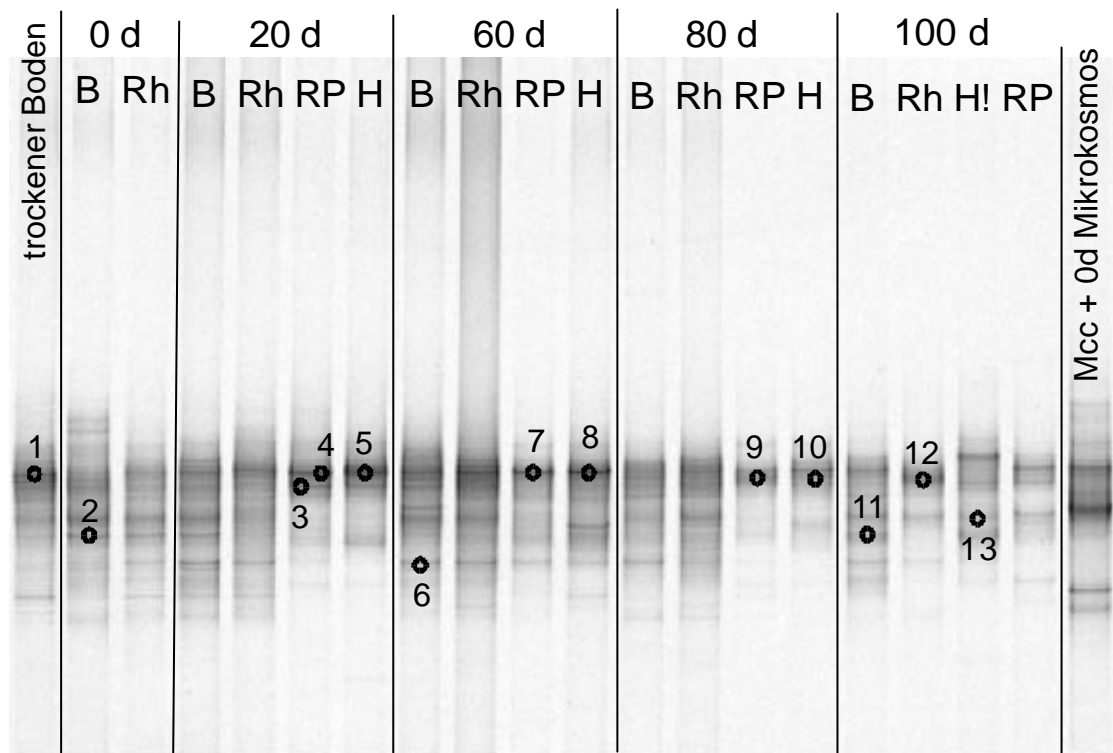
Die Versuche mit dem universellen Primerset zeigten, dass alle Proben amplifizierbar waren. Die DGGE-Auftrennung der Amplifikationsprodukte ergab eine höhere Anzahl von Banden als im Mikrokosmenexperiment, von denen aber viele eine geringere Intensität als die der Mikrokosmenproben hatten (Abbildung 4.23).



**Abbildung 4.23: Änderung der DGGE-Bandenmuster über die Vegetationsperiode von Reis nach Amplifikation der DNA aus Feldproben mit dem universellen Primerset für eubakterielle 16S rDNA.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. "trockener Boden" bezeichnet eine Bodenprobe, die vor dem Fluten des Reisfelds entnommen und in der Ober- und Unterboden gemischt wurden. In der äussersten Bahn rechts wurde eine Mischung aus Amplifikationsprodukt des Stammes *Methylosinus sporium* und einer Nullprobe aus dem Mikrokosmenexperiment aufgetragen, um die Bandenmuster der beiden Experimente besser vergleichen zu können.

Die nach 10 $\gamma$ -Amplifikation erhaltenen DGGE-Muster der Feldproben zeigten eine deutliche Änderung der Anzahl und der Intensität einzelner Banden über die Saison (Abbildung 4.24). Wie mit dem universellen Primerset wurden auch mit dem 10 $\gamma$  Primerset im Feldexperiment mehr Banden pro Kompartiment detektiert

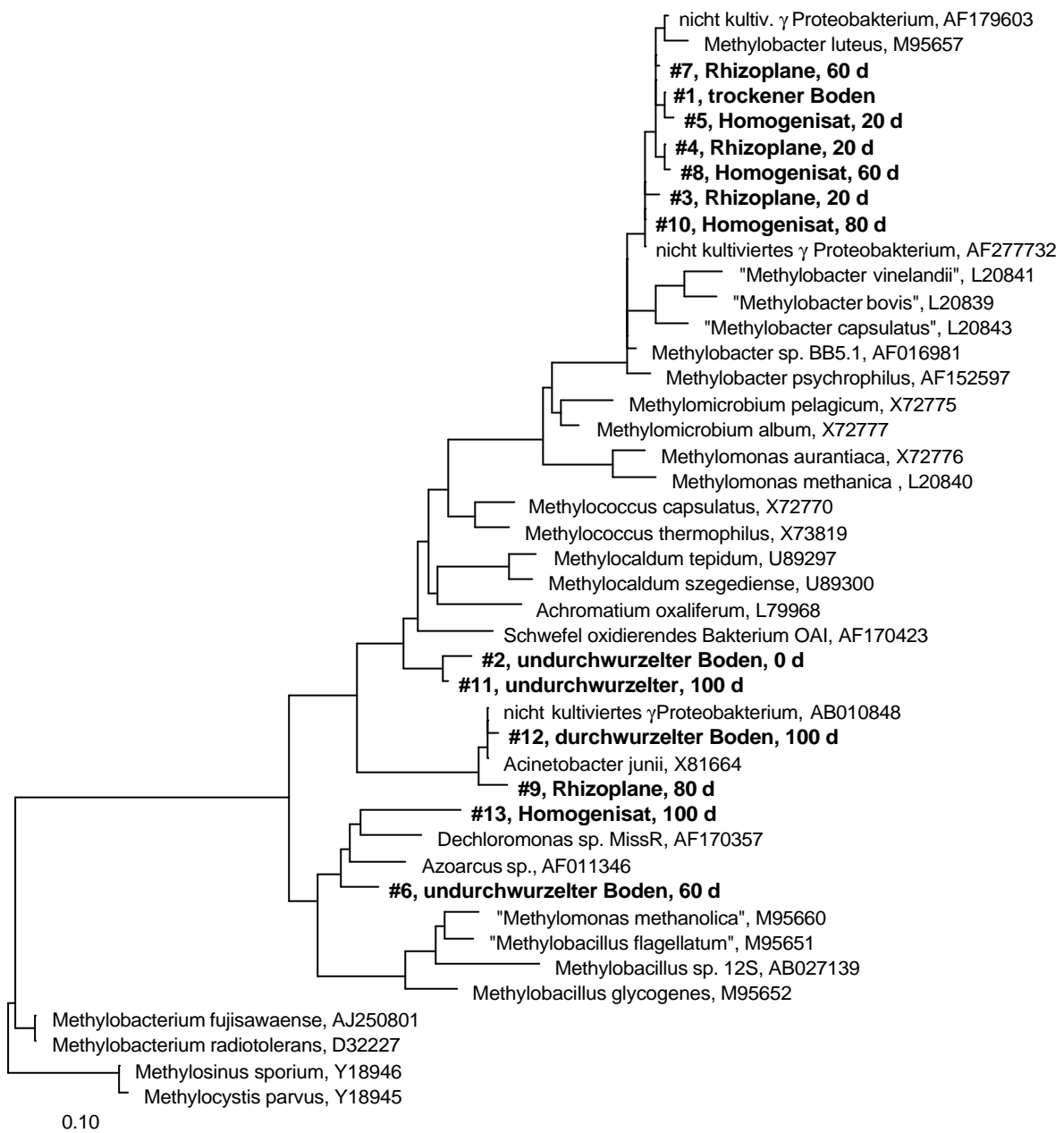
als im Mikrokosmenexperiment. Diese hohe Anzahl führte allerdings auch zu einer verschlechterten Trennung der Banden.



**Abbildung 4.24: Änderung der DGGE-Bandenmuster von Feldproben über die Vegetationsperiode von Reis nach Amplifikation der DNA mit dem 10g-Primerset für RuMP-Weg Methylo trophe.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mcc = *Methylococcus capsulatus*. "trockener Boden" bezeichnet eine Bodenprobe, die vor dem Fluten des Reisfelds entnommen und in der Ober- und Unterboden gemischt wurden. In der äussersten Bahn rechts wurde eine Mischung aus Amplifiaktionsprodukt des Stammes *Methylococcus capsulatus* und einer Nullprobe aus dem Mikrokosmenexperiment aufgetragen, um die Bandenmuster der beiden Experimente besser vergleichen zu können. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.25).

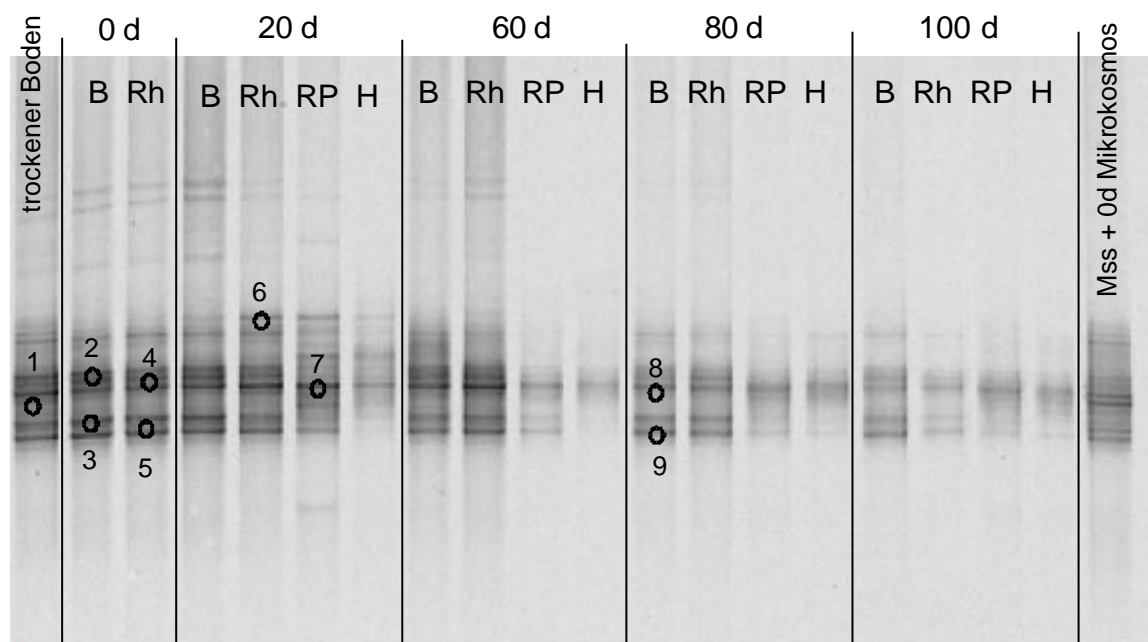
Die Sequenzierung der in Abbildung 4.24 markierten Banden und die anschließende phylogenetische Einordnung der erhaltenen Sequenzen ergab, dass alle Sequenzen, die der Familie der Typ I Methanotrophen zugeordnet wurden, höchste Ähnlichkeit zur Gattung *Methylobacter* aufwiesen (Abbildung 4.25). Die

zugehörigen Banden wurden aus verschiedenen DGGE-Bahnen ausgestochen, zeigten aber eine ähnliche Mobilität im Gel. Alle sequenzierten Banden mit deutlich anderer elektrophoretischer Mobilität konnten nicht den Typ I Methanotrophen zugeordnet werden. Sie zeigten höchste Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Acinetobacter*, *Azoarcus* und *Achromatium* (frühere Bezeichnung *Thiotrix*). Dies stimmte gut mit den in den Mikrokosmenproben detektierten Sequenzen nicht-methylotropher Gruppen überein.



**Abbildung 4.25: Phylogenetische Einordnung von DGGE-Sequenzen aus Feldproben über die Vegetationsperiode von Reis nach 10g-Amplifikation der DNA.** Stammbaum berechnet über Neighbour-Joining. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.24, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reispflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registrierungsnummern der für die Stammbauberechnung verwendeten Sequenz aufgeführt. Abkürzungen: Bakt. = Bakterium, kultiv. = kultiviert

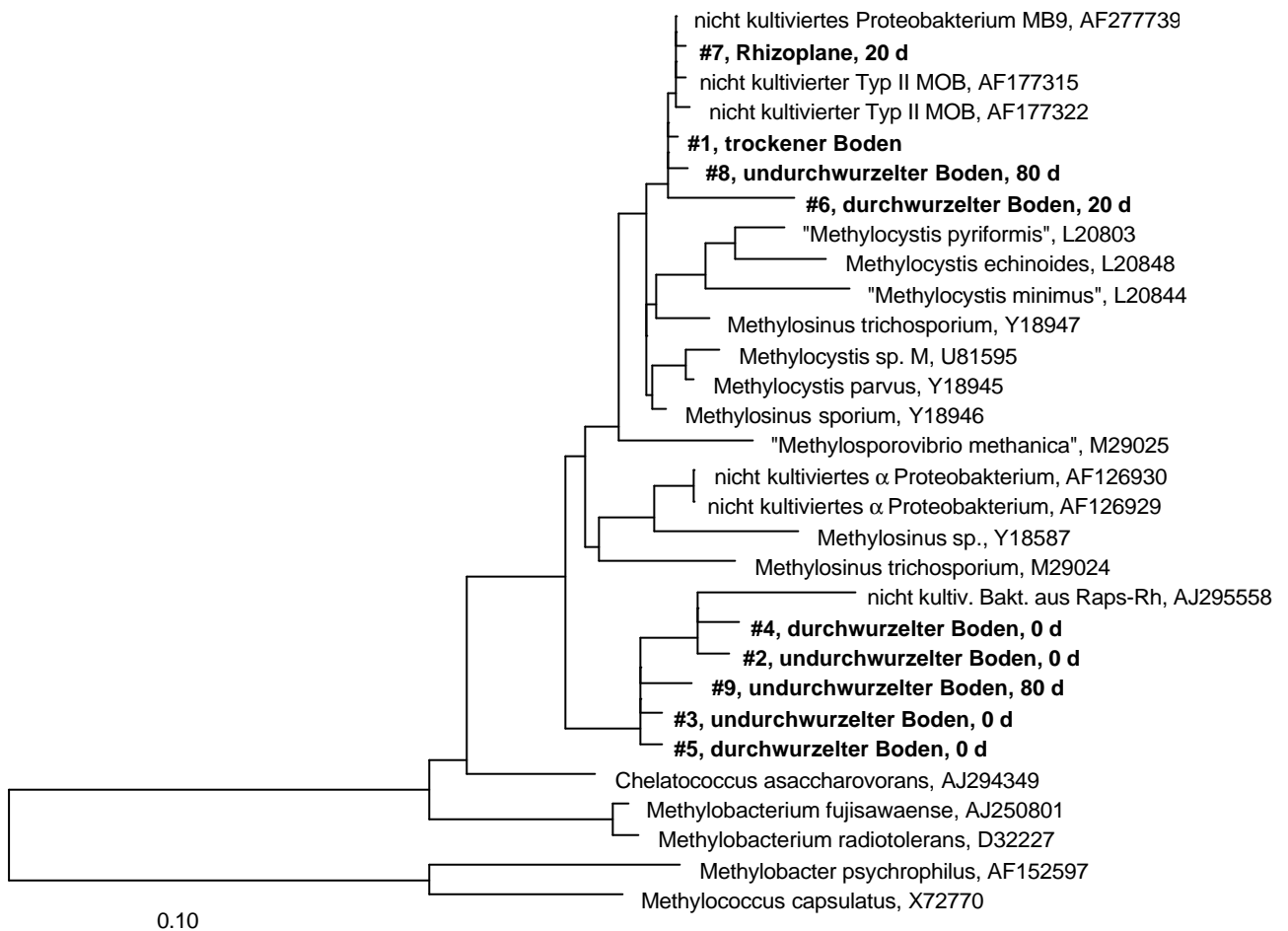
Nach Amplifikation mit dem 9 $\alpha$ -Primerset für Serin-Weg Methylo trope ergab sich über die Kompartimente und die Vegetationsperiode von Reis ein einheitliches DGGE-Bandenmuster (Abbildung 4.26). Die Anzahl der Banden war vergleichbar der in den Mikrokosmenproben detektierten Banden, nur die Intensität einzelner Banden unterschied sich zwischen den beiden Experimenten.



**Abbildung 4.26: Änderung der DGGE-Bandenmuster über die Vegetationsperiode von Reis nach Amplifikation der DNA aus Feldproben mit dem 9 $\alpha$ -Primerset für Serin-Weg Methylo trope.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. "trockener Boden" bezeichnet eine Bodenprobe, die vor dem Fluten des Reisfelds entnommen und in der Ober- und Unterboden gemischt wurden. In der äussersten Bahn rechts wurde eine Mischung aus Amplifikationsprodukt des Stammes *Methylosinus sporium* und einer Nullprobe aus dem Mikrokosmenexperiment aufgetragen, um die Bandenmuster der beiden Experimente besser vergleichen zu können. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.27).

Die Sequenzierung der Hauptbanden ergab allerdings ein anderes Bild als im Mikrokosmenexperiment. Nur vier der Banden konnten der Familie der Typ II

Methanotrophen zugeordnet werden, während fünf weitere Banden höchste Ähnlichkeit zu einer Gruppe von Sequenzen aus verschiedenen Bodenproben zeigten. Das nächstverwandte Isolat zu dieser Gruppe von Sequenzen war *Chelatococcus asaccharovorans* mit 5 bis 8 % nicht-Übereinstimmung zu den Sequenzen der Feldproben.

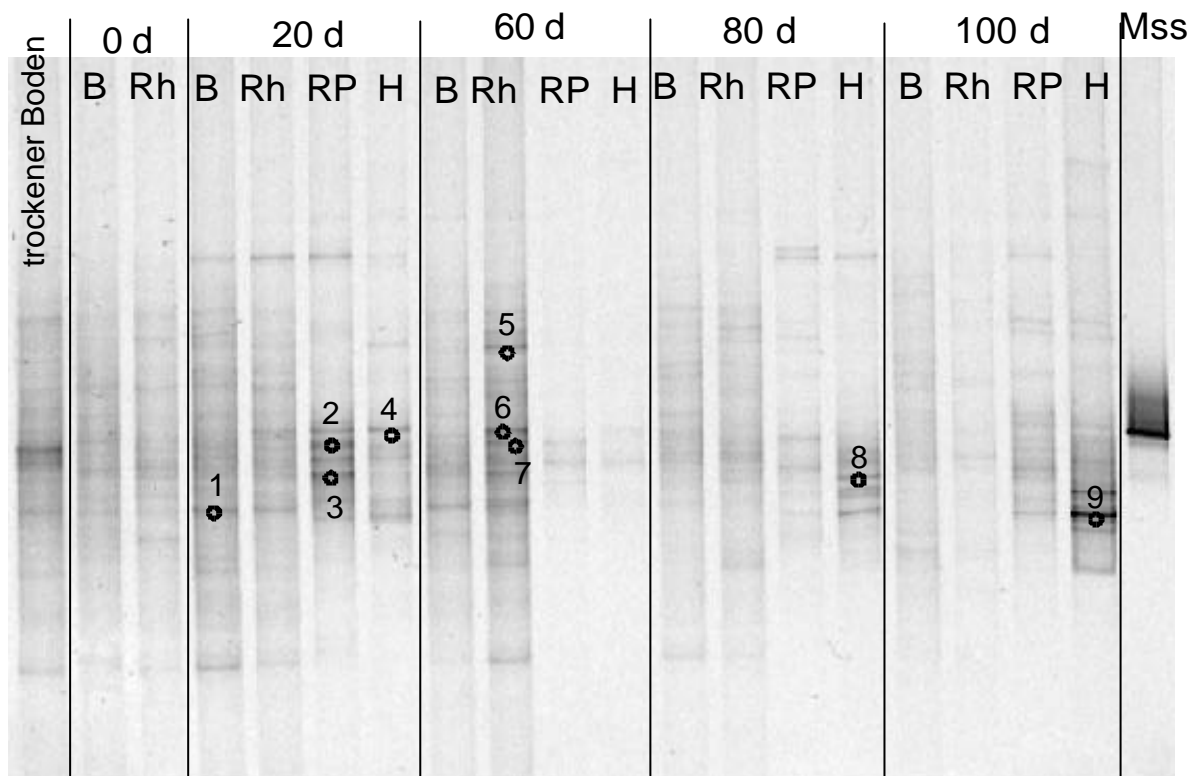


**Abbildung 4.27: Phylogenetische Einordnung von DGGE-Sequenzen aus Feldproben über die Vegetationsperiode von Reis nach 9a-Amplifikation der DNA.** Stammbaum berechnet über Neighbour-Joining. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.26, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reispflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registriernummern der für die Stammbaumberechnung verwendeten Sequenz aufgeführt. Abkürzungen: MOB = Methan oxidierende Bakterien, Rh = durchwurzelter Boden

Diese fünf Sequenzen zeigten untereinander eine hohe Übereinstimmung, obwohl die elektrophoretische Mobilität der zugehörigen DNA unterschiedlich war. Ob sie einer bisher unbekannten Gruppe methylotropher Organismen zuzuordnen sind kann aufgrund der kurzen Sequenzen und mangels vorliegender Isolate nicht entschieden werden.

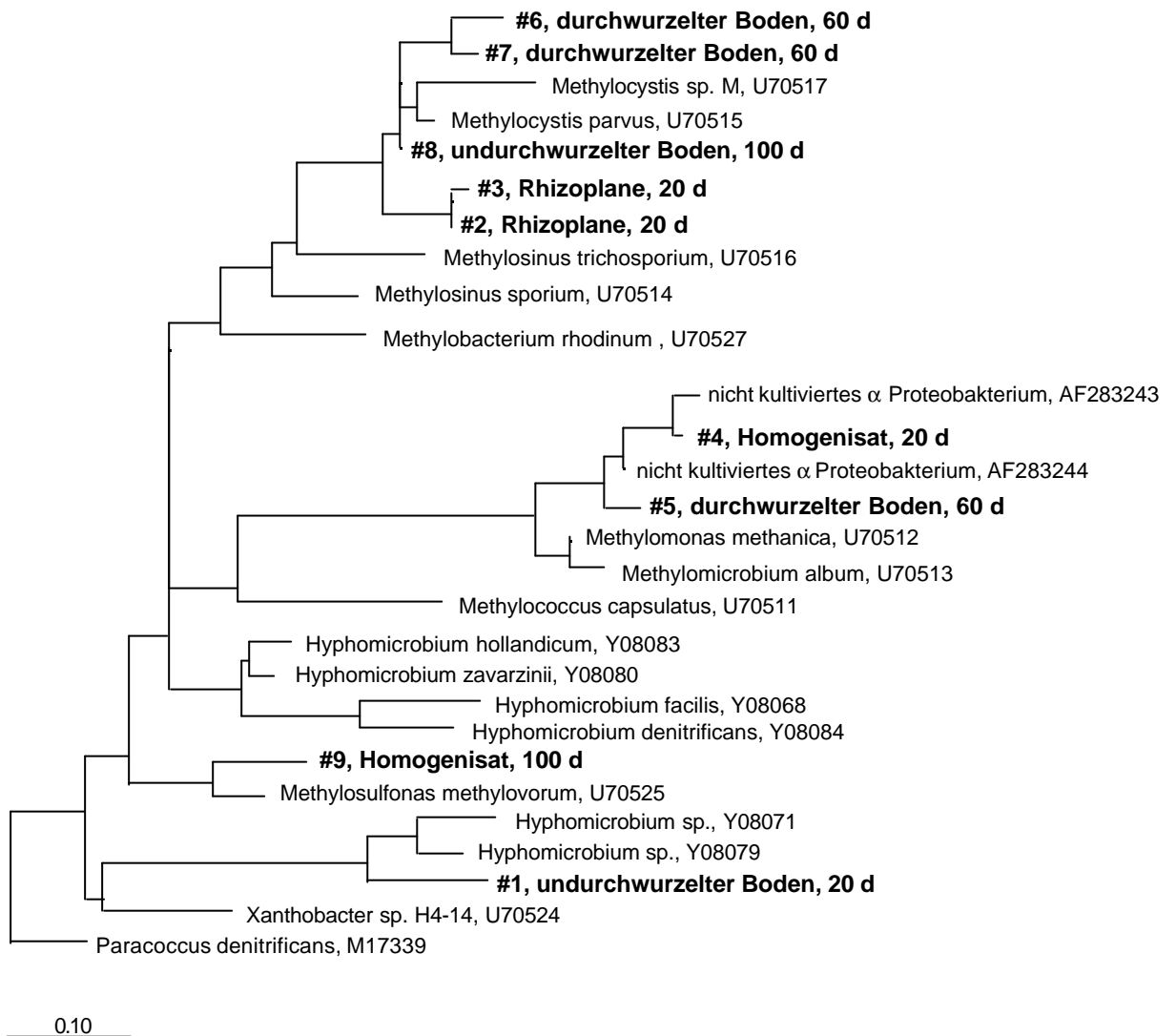
Zusätzlich zu den 16S rRNA-Genen wurde auch ein funktionelles Gen, die  $\alpha$ -Untereinheit der Methanoldehydrogenase (*mxoF*) amplifiziert, das in allen methylotrphen Bakterien vorhanden ist. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die Entwicklung der Gesamtpopulation beider Familien der Methanotrophen und der häufig mit ihnen assoziierten Methylotrphen geben. Die Amplifikationen mit dem *mxoF*-Primerset führten zu sehr unterschiedlichen Mengen Amplifikationsprodukt und ergaben nach ihrer Auftrennung keine deutlichen Bandenmuster (Abbildung 4.28). Im Gegensatz zum Mikrokosmenexperiment war in den Feldproben der Unterschied zwischen den Kompartimenten weniger auffällig. Im Feld wurde auch in Proben des undurchwurzelter Bodens ein deutliches Bandenmuster detektiert. Die Zunahme der Bandenzahl im Homogenisat mit zunehmendem Pflanzenalter war auffällig. Sie stimmte gut mit den hohen MPN-Zahlen für Methan oxidierende Bakterien in diesem Kompartiment überein (Kapitel 4.3.4).





**Abbildung 4.28: Änderung der DGGE-Bandenmuster über die Vegetationsperiode von Reis nach Amplifikation der DNA aus Feldproben mit dem *mxoF*-Primerset für das funktionelle Gen der  $\alpha$ -Untereinheit der Methanoldehydrogenase.** d = Pflanzenalter, B = undurchwurzelter Boden, Rh = durchwurzelter Boden, RP = Rhizoplane, H = Homogenisat, Mss = *Methylosinus sporium*. "trockener Boden" bezeichnet eine Bodenprobe, die vor dem Fluten des Reisfelds entnommen und in der Ober- und Unterboden gemischt wurden. Markierte Banden wurden ausgestochen und sequenziert (Abbildung 4.29).

Die Sequenzen der in Abbildung 4.28 markierten Banden konnten beiden Familien der Methanotrophen sowie den Gruppen *Hyphomicrobium* und *Methylosulfonas* methylootropher Bakterien zugeordnet werden (Abbildung 4.29). Es war kein eindeutiger Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Mobilität und zugehöriger Bakteriengruppe erkennbar. Auch ein Trend bezüglich des bevorzugten Kompartiments (z.B. Typ I Methanotrophe nur an der Rhizoplane) oder einer bevorzugten Aktivitätsphase (z.B. Mitte der Saison) konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 4.29: Phylogenetische Einordnung von DGGE-Sequenzen aus Feldproben über die Vegetationsperiode von Reis nach *mx*aF-Amplifikation der DNA.** Stammbaum berechnet über Maximum Parsimony. Die Bezeichnung der Sequenzen setzt sich zusammen aus der Nummer der DGGE-Bande in Abbildung 4.28, gefolgt von Angaben zum Kompartiment und dem Alter der Reispflanze [d]. Vergleichsorganismen sind mit den Registrierungsnummern der für die Stammbaumberechnung verwendeten Sequenz aufgeführt.

#### 4.3.5.1. Untersuchung zur Dominanz einer Familie der Methanotrophen im Reisfeld

Die Untersuchungen zur *in-situ* Dominanz von Typ I oder Typ II Methanotrophen wurden im Mikrokosmenexperiment mit Hilfe der familienspezifischen Sonden mit FISH durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.7). Aufgrund der geringen Zellzahlen in den Feldproben konnten keine aussagekräftigen Werte über Auszählungen mit FISH erhalten werden. Um dennoch einen Einblick in die mögliche Zellzahlverteilung *in-situ* zu erhalten, wurden PCR-Amplifikationen mit DNA aus den höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen der MPN-Ansätze vorgenommen. Es wurden MPN-Ansätze aus allen Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode (Kapitel 4.3.4) mit den Primersets universell, 10 $\gamma$  und 9 $\alpha$  amplifiziert. Die Ansätze mit dem universellen Primerset dienten auch hier zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA. Nachdem aus allen Proben mit diesem Primerset ein PCR-Produkt erhalten wurde, sollte das Kriterium "PCR-Produkt ja/nein" bei Verwendung der spezifischen Primersets 9 $\alpha$  und 10 $\gamma$  auf das Vorhandensein der jeweiligen Bakteriengruppe in der entsprechenden Zellzahl hindeuten. Dies wäre ein Anzeichen für die Dominanz der Familie der Methanotrophen, mit deren Primerset ein Produkt erhalten wurde. Allerdings ist diese Methode sowohl mit den Fehlern der PCR und der verwendeten Primer (falsch positive Gruppen, siehe z.B. Kapitel 4.3.5) behaftet als auch mit möglichen Veränderungen der relativen Populationsstruktur durch Kultivierung (MPN). Die Ergebnisse können daher nur einen ersten Hinweis auf die Dominanz einer Bakteriengruppe geben.

Die PCR-Ansätze mit dem universellen Primerset für eubakterielle 16S rDNA ergaben, dass alle verwendeten Proben amplifizierbare DNA enthielten. Für die beiden spezifischen Primersets konnte kein Unterschied in der Amplifizierbarkeit der Proben festgestellt werden. In allen Ansätzen war mit beiden Primersets ein PCR-Produkt vorhanden. Demnach waren im Feldversuch in allen Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode Typ I und Typ II Methanotrophe in vergleichbarer Zellzahl vorhanden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Entwicklung der Aktivität Methan oxidierender Bakterien über die Vegetationsperiode von Reis

Die Methan oxidierenden Bakterien können durch die Umsetzung von Methan die Emission dieses Treibhausgases aus gefluteten Reisfeldern deutlich verringern (Schütz *et al.* 1989, Sass *et al.* 1992, Gilbert und Frenzel 1995, Denier van der Gon 1996, Tyler *et al.* 1997). Durch die Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft und die Aufdeckung möglicher Limitierungen dieser Bakterien im Reisfeld könnten Methoden für eine gezielte Einflussnahme auf ihre *in-situ* Aktivität entwickelt werden.

Zur Untersuchung der Populationsdynamik und Diversität der Methan oxidierenden Bakterien im Reisfeld wurden zwei verschiedene Versuchsansätze miteinander verglichen: Ein Mikrokosmenexperiment und eine Studie in einem Reisfeld in Vercelli, Norditalien. Für die Mikrokosmen wurden die äusseren Bedingungen den mittleren Werten im Reisfeld angepasst. So wurde die Temperatur entsprechend der mittleren Temperatur im Feld gewählt, eine hohe Luftfeuchtigkeit eingestellt und eine dauerhafte "Überflutung" des Bodens aufrechterhalten. Zusätzlich wurden Reisfeldboden und Reissamen aus Vercelli verwendet. Auch die Gesamtmenge des eingebrachten Düngers wurde der im Feld eingesetzten Menge angepasst. Allerdings wurden die Mikrokosmen wöchentlich gedüngt, um eine möglichst gleichmässige Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Im Feld ist dies technisch nicht möglich.

Das Mikrokosmenexperiment bot so die Möglichkeit, die Entwicklung der methanotrophen Bakterien in einem Modellsystem zu untersuchen, in dem nur die Fortdauer der Inkubation des gefluteten Systems und die dabei ablaufenden Redoxprozesse, sowie das Wachstum der Reispflanze Änderungen verursachten. Die Einflüsse der Witterung (Regen, Temperaturwechsel), der Feldbearbeitung (z.B. Pestizidausbringung) und umgebender Pflanzen- (Echinochloa, Heteranthera) und Tierwelt (Bioturbation) waren ausgeschaltet.

Durch die Verwendung von kompartimentierten Mikrokosmen, in denen durchwurzelter und völlig undurchwurzelter Boden parallel vorlagen, konnte der Einfluss

der Reiswurzel auf den sie umgebenden Boden deutlicher dargestellt werden, als dies im Reisfeld möglich war.

Die Übertragbarkeit der im Modellsystem erhaltenen Ergebnisse auf die im Agrarökosystem vorliegenden Verhältnisse wurde mit Hilfe der Feldstudie überprüft. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden im Feldversuch die gleichen Methoden zur Untersuchung von Aktivität, Populationsdynamik und Diversität angewandt wie im Mikrokosmenexperiment.

Zur Beschreibung der tatsächlich in einem Ökosystem ablaufenden Prozesse ist ihre direkte Messung bei möglichst geringer Störung des Systems (*in-situ*) nötig. Solche Messungen erlauben allerdings im allgemeinen nur die Bestimmung von Summenparametern, die häufig keine Rückschlüsse auf die einzelnen Prozesse zulassen. Daher ist eine Kombination von *in-situ* Messungen und Untersuchungen einzelner Parameter in Proben aus dem System (*in-vitro*) zur genaueren Charakterisierung notwendig. In dieser Arbeit wurden daher z.B. Flussmessungen und Porenwasseranalyse (*in-situ*) mit Untersuchungen der potentiellen Methanoxiderationsraten in verschiedenen Kompartimenten des Systems (*in-vitro*) verglichen.

#### **5.1.1. Vergleich der Methanemissionen im Mikrokosmen- und Feldexperiment**

Um die Auswirkung der im Gesamtsystem ablaufenden Prozesse auf die Entwicklung der Methanemission über die Saison zu erfassen, wurden Methanflussmessungen durchgeführt (Kapitel 3.4.1). Die Methanemission aus Reismikrokosmos oder -feld ist die Summe der im System ablaufenden Methanproduktion und -oxidation und kann daher als wichtiger Vergleichsparameter zwischen verschiedenen Systemen herangezogen werden. Die Verwendung des für die Methanoxidation spezifischen Inhibitors Difluormethan liess zusätzlich eine Berechnung des Prozentsatzes der *in-situ* vorliegenden Methanoxidation zu (Matheson *et al.* 1997, Miller *et al.* 1998).

Der prinzipielle Verlauf der Methanemission über die Vegetationsperiode der Reispflanzen war zwischen Mikrokosmen und Feld vergleichbar (Abbildung 4.2 und 4.17). Das Maximum der Emission im Feld zu Beginn der Saison wird auf den Abbau organischen Materials – wie Stroh und Wurzelreste – im Boden zurückgeführt (Schütz *et al.* 1989a, Minami und Neue 1994, Khalil *et al.* 1998a und b). Da

für die Mikrokosmen gesiebter Boden verwendet wurde, der kein Stroh mehr enthielt, trat hier nur ein Maximum der Methanemission zu Beginn der reproduktiven Wachstumsphase der Reispflanzen auf.

Die absoluten Methanemissionen, aber auch die Methanoxidation *in-situ* und *in-vitro* war im Mikrokosmos höher als im Feld (Kapitel 4.2.3 und 4.3.3). Es lagen aber dennoch im Mikrokosmos höhere Methankonzentrationen im Bodenporenwasser vor. Dies könnte auf eine höhere Methanproduktionsrate zurückgeführt werden, die durch eine höhere mittlere Inkubationstemperatur im Vergleich zum Feld verursacht worden sein könnte (Schütz *et al.* 1990a, Sass *et al.* 1991, Chanton *et al.* 1997). Auch die höhere Wurzeldichte im Mikrokosmos könnte durch die Beeinflussung der methanogenen Archaea zu erhöhten Methankonzentrationen im Bodenporenwasser geführt haben (Kimura 1997, Dannenberg und Conrad 1999). Da die Emission des Methans zu bis zu 90 % über die Pflanzen erfolgt (Schütz *et al.* 1989a, Denier van der Gon und van Breemen 1993; Yu *et al.* 1997), führte die grössere Pflanzenmasse pro Bodenoberfläche im Mikrokosmos bei gleichzeitig hoher Methanproduktionsrate im Boden zu den beobachteten erhöhten Methanemissionen (Byrd *et al.* 2000, Aulakh *et al.* 2000).

Auch die geringeren Methankonzentrationen im durchwurzelten im Vergleich zum undurchwurzelten Boden der Mikrokosmen (Abbildung 4.5) und des Felds (Krüger 2000) können zum Teil auf den besseren Abtransport des gebildeten Methans aus dem Boden über die Pflanze zurückgeführt werden. Zusätzlich spielt die höhere Methanoxidationsaktivität in diesem Kompartiment eine Rolle.

#### **5.1.2. Kurzzeitiger Einfluss der *in-situ* Methanoxidation auf die Methanemission**

Die Untersuchungen zur *in-situ* Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien ergaben im Mikrokosmenexperiment nur einen kurzzeitigen Einfluss der Methanoxidation auf die Methanemissionsraten. Dieser Verlauf der Methanoxidation wurde im Feldexperiment bestätigt, steht aber im Gegensatz zu früheren Untersuchungen an Reis, in denen 20 bis 25 % *in-situ* Methanoxidation über die gesamte Vegetationsperiode nachgewiesen wurden (Denier van der Gon 1996, Gilbert und Frenzel 1995 und '98, Bosse und Frenzel 1998). Dieser unterschiedlich lang andauernde Einfluss der Methanoxidation könnte auf die Verwendung verschiedener

Reissorten (ROMA in den zitierten Artikeln, KORAL in dieser Arbeit) zurückzuführen sein (Denier van der Gon 1996, Bilek *et al.* 1999). Die Art des Mikrokosmensystems und Unterschiede in den Inkubationsbedingungen - wie z.B. Düngung und Lichtintensität – könnten zu Veränderungen der Reispflanzen bezüglich ihrer Gaswegigkeit, Sauerstoffpermeabilität und Nährstoffaufnahme geführt haben, die wiederum die *in-situ* Aktivität der Methanotrophen beeinflussten (King 1990, King *et al.* 1990).

Ein weiterer und wahrscheinlich bedeutenderer Unterschied ist allerdings die Verwendung eines neuen Inhibitors für die Methanoxidation, Difluormethan ( $\text{CH}_2\text{F}_2$ ). Difluormethan inhibiert die Methanoxidation spezifisch, ohne die Methanproduktion zu beeinflussen (Miller *et al.* 1997, Matheson *et al.* 1998, Krüger 2000). Dagegen kann die Hemmung der Methanoxidation über die Einführung anaerober Bedingungen (z.B. durch Austausch der Gasphase mit Stickstoff (Gilbert und Frenzel 1995, Bosse und Frenzel 1998)) die Methanproduktion stimulieren. Bei der Berechnung der *in-situ* Methanoxidation aus der Differenz der Flüsse mit und ohne Inhibierung führt dies zu einer Überschätzung des Anteils der Methanoxidation im System. Die zur Inhibierung der Methanoxidation verwendeten Gase Methylfluorid (Bosse und Frenzel 1996) und Ethin (Acetylen) (Oremland und Culbertson 1992) hemmen auch die Methanproduktion (Raimbault 1975, Sprott *et al.* 1982, Janssen und Frenzel 1997, Conrad und Klose 1999) und verfälschen dadurch die für die *in-situ* Methanoxidation berechneten Werte. Die hier dargestellten Messungen mit dem Inhibitor Difluormethan sollten daher die Entwicklung der Methanoxidation *in-situ* genauer wiedergeben als die in früheren Studien angewandten Methoden.

### **5.1.3. Ist die Aktivität Methan oxidierender Bakterien in Reisfeldern limitiert?**

Zur genaueren Untersuchung der kleinträumig ablaufenden Prozesse an der Reisswurzel und im umgebenden Boden wurden Proben aus den Mikrokosmen und dem Reisfeld entnommen und *in-vitro* auf ihre potentiellen Methanoxidationsraten hin untersucht. Diese potentiellen Raten sind ein Maß für die unter optimierten Bedingungen mögliche Aktivität z.B. einer Bakteriengruppe in einer Probe. Die Initialrate und die Lag-Phase (Kapitel 3.4.5) der potentiellen Methanoxidation lassen Rückschlüsse auf die zum Zeitpunkt der Probenahme vorliegenden

Verhältnisse im Feld/Mikrokosmos zu.

Der Vergleich der *in-situ* Aktivität und der Initialraten der *in-vitro* Messungen zeigte eine zeitliche Diskrepanz im Rückgang der aktuellen (*in-situ*) und der potentiellen (*in-vitro*) Aktivität in den Bodenkompartmenten. Im Mikrokosmenexperiment und im Feldversuch wurde gezeigt, dass die *in-situ* Aktivität der methanotrophen Bakterien nur einen kurzzeitigen Einfluss auf die Methanemissionen hatte (Kapitel 4.2.1 und 4.3.1). Im Vergleich zur *in-situ* Aktivität gingen die Initialraten der potentiellen Methanoxidation in den Bodenkompartmenten erst deutlich später in der Vegetationsperiode zurück (Kapitel 4.2.3 und 4.3.2). Diese Beobachtungen trafen sowohl für das Mikrokosmenexperiment als auch für den Feldversuch zu. Der Vergleich der Aktivitäten weist darauf hin, dass die Methanotrophen noch in aktiver Form im Reisfeld vorlagen, aber *in-situ* limitiert wurden. Diese Limitierung wurde in den Ansätzen zur Messung der potentiellen Methanoxidation scheinbar aufgehoben, so dass die Zellen das angebotene Methan umsetzen konnten. Da die Methanotrophen sowohl Methan als auch Sauerstoff für ihren Stoffwechsel benötigen, wäre eine Limitierung durch die Abwesenheit einer dieser Komponenten naheliegend. Da die Methankonzentrationen im Porenwasser der Mikrokosmen aber über die gesamte Vegetationsperiode nicht unter 500  $\mu\text{M}$  absanken (Abbildung 4.5), konnten sie die Methan oxidierenden Bakterien nicht limitieren. Auch im Reisfeld wurden ansteigende Methankonzentrationen im Porenwasser mit zunehmendem Alter der Pflanzen gefunden (Krüger 2000), so dass auch im Feld keine Limitierung durch Methan vorlag. Für die zweite Komponente - Sauerstoff - wurde in Mikrokosmenexperimenten mit Hilfe von Mikroelektrodenmessungen gezeigt, dass seine Konzentrationen über die Vegetationsperiode von Reis abnahmen (Frenzel *et al.* 1992). Allerdings konnte auch in 70 Tage alten Mikrokosmen noch Sauerstoff im durchwurzelten Boden nachgewiesen werden (Arth und Frenzel 2000), der - übertragen auf das in dieser Arbeit dargestellte System - eine länger anhaltende *in-situ* Aktivität der Methanotrophen ermöglichen sollte. Diese beiden grundlegenden Stoffwechseledukte lassen demnach keine schlüssige Erklärung für die *in-situ* Limitierung der Methanoxidation zu.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Aktivität Methan oxidierender Bakterien ist die Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen. Durch die wöchentliche Düngung der Mikrokosmen sollte eine gleichmässige Versorgung mit Nährstoffen erreicht werden. Wie die Messungen der Ammoniumkonzentration im Porenwasser



zeigten, reichten diese Düngergaben aber nicht aus, um einen gleichmässig hohen Ammoniumgehalt im Porenwasser über die Vegetationsperiode zu erhalten. Die Ammoniumkonzentrationen nahmen innerhalb der ersten Wochen des Pflanzenwachstums auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze ab (Abbildung 4.6). Ein Vergleich der Ammoniumkonzentrationen im Porenwasser mit dem Verlauf der *in-situ* Methanoxidation zeigte, dass beide Kurven sehr gut miteinander korrelierten (Abbildung 4.6). Dies liess den Rückschluss zu, dass die Methan oxidierenden Bakterien im Mikrokosmenexperiment *in-situ* durch einen Mangel an verfügbaren Stickstoffverbindungen limitiert wurden. Da das Reisfeld nur zu zwei Zeitpunkten gedüngt wurde, nämlich vor dem Fluten und zu Beginn der reproduktiven Wachstumsphase der Reispflanzen (Tabelle 3.4), war auch in diesem System ein schneller Rückgang der Ammoniumkonzentrationen aufgrund der Aufnahme des Stickstoffs durch die Reispflanze zu erwarten und auch zu beobachten (Krüger 2000). Ein ähnlich schneller Rückgang der Stickstoffkonzentrationen im Porenwasser im Reisfeld wurde von Dobermann *et al.* (1994) beobachtet.

Der positive Einfluss von Stickstoffdüngungen auf die Aktivität methanotropher Bakterien konnte zuerst von Bodelier *et al.* (2000a und b) gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen an Reismikrokosmen ergaben, dass nach einem Rückgang der *in-situ* Methanoxidation diese durch Harnstoffdüngung wieder aktiviert werden konnte (Krüger 2000). Zusätzlich zeigten Versuche mit einer stickstofflimitierten Batchkultur von *Methylosinus sporium* OB3b, dass die Aktivität der Methanoxidation durch Zugabe von Ammonium wiederhergestellt werden konnte (Frenzel, persönliche Mitteilung).

Diese Stimulierung der Methanotrophen durch Zugabe von Stickstoffverbindungen steht im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen eine Hemmung der Methanotrophen durch erhöhte Stickstoffkonzentrationen festgestellt wurde. Diese Untersuchungen wurden allerdings nicht an gefluteten Reisfeldern durchgeführt, sondern mit (Wald)Böden (Schnell und King 1994, Steudler *et al.* 1989), Sedimenten (Bosse *et al.* 1993, van der Nat *et al.* 1997) oder Boden aus Trockenreisanbau (Dubey und Singh 2000). Der hemmende Effekt des Ammoniums wurde auf eine kompetitive Hemmung der Methan-Monooxygenase zurückgeführt. Durch einen Überschuss von Ammonium würden demnach die aktiven Zentren des Enzyms reversibel belegt und somit eine Umsetzung des

Methans verhindert. Diese kompetitive Hemmung ist im gefluteten Reisfeld nicht zu erwarten. Im Gegensatz zu anderen Böden ist das geflutete Reisfeld durch hohe Methankonzentrationen im Porenwasser auch des durchwurzelten Bodens charakterisiert (siehe oben). Diese hohen Methankonzentrationen führten zu einem erhöhten  $\text{CH}_4:\text{NH}_4^+$ -Verhältnis im Boden und dadurch zu einer Verringerung des Hemmeffekts von Ammonium. Diese Aufhebung der Ammoniumhemmung durch hohe Methankonzentrationen wurde bereits von verschiedenen Autoren diskutiert (King und Schnell 1994, van der Nat *et al.* 1997, Cai und Mosier 2000). Im Reisfeld bzw. -mikrokosmos lag das Methan in so grossem Überschuss vor, dass auch eine Ammoniumdüngung nicht zur kompetitiven Hemmung der Methan-Monooxygenase führte.

Neben der Wirkung von Ammonium selbst können auch toxische Stoffwechselprodukte wie z.B. Nitrit oder hohe Ionenkonzentrationen die Methanotrophen hemmen (King und Schnell 1994, Hütsch 1998). Die schnelle Aufnahme von Ionen durch die Reispflanze verhinderte allerdings im Reisfeld eine Anreicherung dieser Komponenten und damit eine durch sie verursachte Hemmung der Methan oxidierenden Bakterien.

Die *in-situ* Limitierung der Methanotrophen durch Stickstoff wurde *in-vitro* wahrscheinlich durch den Sauerstoffeintrag in die Bodensuspensionen und eine erhöhte Mineralisierung aufgehoben. Der Sauerstoffeintrag führte zu einer Erhöhung des Redoxpotentials, die wiederum zu einer Freisetzung des an Tonminerale gebundenen Ammoniums führte (Schneiders und Scherer 1998, Scherer und Zhang 1999). Zusätzlich ermöglichte die Sauerstoffverfügbarkeit eine verstärkte Mineralisierung des im Reisfeldboden und in den Reisswurzeln biologisch gebundenen Stickstoffs. Die Akkumulation von Ammonium konnte in oxischen Inkubationen mit Reisfeldboden nachgewiesen werden (Dan, unveröffentlicht).

## **5.2. Populationsdynamik Methan oxidierender Bakterien im Reisfeld**

Während der Vegetationsperiode von Reis kommt es im Reisfeldboden zu Änderungen der Umgebungsbedingungen für die Mikroorganismen. Kleinstäumig verändern sich z.B. die Sauerstoffkonzentrationen durch das Wachstum der

Reiswurzeln durch den Boden (Flessa und Fischer 1992). Zudem nimmt die Reispflanze Nährstoffe aus dem Boden auf verringert dadurch deren Verfügbarkeit für die Mikroorganismen. Auch Änderungen im Exsudationsverhalten der Wurzeln haben einen Einfluss auf Aktivität, Grösse und Diversität mikrobieller Populationen im Reisfeldboden (Minoda *et al.* 1996, Dannenberg und Conrad 1999, Watanabe *et al.* 1999). Um die Entwicklung der Methanotrophen über die Vegetationsperiode von Reis zu verfolgen, wurde die Gesamtgrösse ihrer Population zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

#### **5.2.1. Entwicklung der Zellzahlen Methan oxidierender Bakterien über die Vegetationsperiode von Reis, bestimmt nach der MPN-Methode**

Zur Untersuchung der Populationsdynamik wurde die klassische Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl (Most probable number, MPN) durch Ausverdünnen und Kultivieren der Proben verwendet. Beide Familien der Methan oxidierenden Bakterien konnten unter den gewählten Inkubationsbedingungen wachsen, so dass die mit dieser Methode bestimmte Zellzahl die Grösse der Gesamtpopulation der kultivierbaren Methanotrophen wiedergab.

Im Mikrokosmenexperiment wurde eine deutliche Zunahme der Zellzahl über die Vegetationsperiode in allen Kompartimenten festgestellt. Diese Zunahme setzte sich auch nach dem Rückgang der *in-situ* Oxidationsaktivität fort. Die Maximalwerte der Zellzahlen wurden bei 70 bis 80 Tage alten Pflanzen erreicht (Kapitel 4.2.5), während die *in-situ* Methanoxidation bereits im Pflanzenalter von knapp 60 Tagen auf vernachlässigbare Werte zurückging (Kapitel 4.2.1). Diese Diskrepanz könnte auf die parallele Detektion von vegetativen Zellen und Dauerstadien mit der MPN-Methode zurückzuführen sein. Da viele Methanotrophe unter Mangelbedingungen Dauerstadien (Cysten, Sporen) bilden (Whittenbury *et al.* 1970b, Roslev und King 1995, Green 1992), stieg die detektierte Zellzahl weiter an, obwohl die Zahl der vegetativen Zellen nicht weiter anstieg. Auch eine geringe, fortdauernde *in-situ* Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze der Hemmstoffmessungen könnte den fortdauernden Zuwachs an Methanotrophen erklären.

Im Feldversuch erreichten die Zellzahlen der Methanotrophen ihren Maximalwert nach 60 bis 80 Tagen Pflanzenwachstum (Kapitel 4.3.4) und zeigten damit eine ähnliche Diskrepanz zur *in-situ* Aktivität wie die Zellzahlen des Mikrokosmenex-

periments. Durch das Wachstum der Gesamtpopulation der Methanotrophen während der Vegetationsperiode von Reis können Verluste der Population ausgeglichen werden, die z.B. im Winter (Trockenlegung der Felder, Methanmangel unter aeroben Verhältnissen) oder durch Grazing auftreten.

Neben der Zunahme der Zellzahl der Methanotrophen im Gesamtsystem konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kompartimenten festgestellt werden. Im Mikrokosmenexperiment war das Wachstum der Methanotrophen im durchwurzelten Boden deutlich stärker als im undurchwurzelten Boden (Kapitel 4.2.5). Die stärkste Zunahme der Anzahl methanotropher Bakterien wurde in der Rhizoplane der Reisswurzeln detektiert. Beide Ergebnisse verdeutlichen den positiven Einfluss der Reisswurzel auf das Wachstum der Methan oxidierenden Bakterien. Die Zunahme der Zellzahl auch im durchwurzelten Boden zeigte deutlich, dass der Einfluss der Wurzel (diffusive Sauerstoffabgabe) nicht nur direkt an der Oberfläche (Rhizoplane) wirkte, sondern darüber hinaus auch den umgebenden Boden erreichte (Frenzel *et al.* 1999, Allen 1997, Arth und Frenzel 2000). Da die Methanotrophen sowohl Sauerstoff als auch Methan für ihr Wachstum benötigen, war ein bevorzugtes Wachstum in den wurzelbeeinflussten Kompartimenten zu erwarten. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Gilbert (1997) und Bosse (1995) bei Untersuchungen an Reispflanzen aus Mikrokosmenexperimenten.

Der Einfluss der Reisswurzel auf den sie umgebenden Boden war im Mikrokosmenexperiment deutlicher zu erkennen als im Feldversuch. Dies ist auf eine striktere Trennung des durchwurzelten und undurchwurzelten Bodens in den kompartimentierten Mikrokosmen zurückzuführen (Kapitel 3.2.1). Auch die vollständige Durchwurzelung des gesamten zur Verfügung stehenden Bodens im Rhizosphärenzylinder der Mikrokosmen führte zu einem verstärkt sichtbaren Wurzeinfluss auf den umgebenden Boden, da eine solche Wurzeldichte im Feld nicht erreicht wurde. Eine andere mögliche Erklärung des weniger deutlichen Wurzeinflusses auf den Boden im Feldversuch kann das stärkere Anhaften der Methanotrophen an der Wurzel sein. Dieses verstärkte Anhaften an den Reisswurzeln im Feld wurde durch die im Vergleich zum Mikrokosmenversuch höheren Zellzahlen der Methanotrophen im Homogenisat deutlich. Dadurch würden bei der Gewinnung des durchwurzelten Bodens weniger Methanotrophe von der Wurzeloberfläche abgewaschen und die Zellzahl im durchwurzelten Boden verringert, bei gleichzeitiger relativer Erhöhung in den Wurzelkompartimenten.

Die Beobachtung, dass im Mikrokosmenexperiment im Homogenisat der Reisswurzeln fast 10 % der Zellzahlen der Rhizoplane detektiert wurden und im Feldexperiment die Zellzahlen im Homogenisat sogar höher waren als in der Rhizoplane, ist besonders im Hinblick auf frühere Untersuchungen interessant, in denen Methanoxidation auch im Spross der Reispflanze festgestellt wurde (Bosse und Frenzel 1997). Zudem konnten Methanoxidierende Bakterien auch im Xylem der Reisswurzel nachgewiesen werden (Gilbert *et al.* 1998). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Methanoxidierenden Bakterien das Innere der Reisswurzel besiedeln können. Allerdings konnte mit den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen kein Beweis für eine solche Besiedlung erbracht werden, wenn auch eine starke Anheftung der Methanotrophen an die Reisswurzeln deutlich wurde.

Der Rückgang der detektierten Zellzahlen zum Ende der Vegetationsperiode (Kapitel 4.2.5 und 4.3.4) kann auf ein Absterben der vegetativen Zellen zurückgeführt werden. Es wurden somit zum Ende der Vegetationsperiode wohl hauptsächlich Dauerstadien detektiert. Eine Möglichkeit, den Anteil an Dauerstadien zu bestimmen, wären parallele MPN-Ansätze mit unbehandelten und pasteurisierten Proben.

### **5.2.2. Kultivierungsunabhängige Methoden zur Beobachtung der Zellzahl und Aktivität Methanoxidierender Bakterien**

Frühere Arbeiten zeigten, dass eine natürliche mikrobielle Lebensgemeinschaft durch Kultivierung oft nicht vollständig erfasst werden kann. Weniger als 1 % der im Boden vorhandenen Mikroorganismen wurden über Kultivierungstechniken detektiert (Amann *et al.* 1995). Um die Nachteile einer Kultivierung zu umgehen und gleichzeitig zwischen vegetativen Zellen und Dauerstadien unterscheiden zu können, ist der spezifische Nachweis einzelner Zellen und ihres Aktivitätszustands im System eine mögliche Lösung.

In Versuchen mit Stammkulturen der Methanoxidierenden Bakterien wurde daher die Möglichkeit einer Anpassung von Vitalfärbungen für diese Bakteriengruppe untersucht. Die Kombination von Vitalfärbung und spezifischer Detektion einer Bakteriengruppe über z.B. Antikörper oder Fluoreszenz markierte Oligonukleotidsonden würde nicht nur eine Aussage über die tatsächliche Grösse der Population im Boden ermöglichen, sondern zusätzlich auch einen Einblick in den Aktivitätszu-

stand einzelner Zellen *in-situ* geben.

#### 5.2.2.1. Vitalfärbungen von Methan oxidierenden Bakterien

Zum Nachweis der Vitalität respiratorisch aktiver Zellen wurden mehrfach Tetrazoliumsalze benutzt und empfohlen (Rodriguez *et al.* 1992, Schaule *et al.* 1993, Pyle *et al.* 1995, Smith und McFeters 1996 und 1997, Marsh *et al.* 1998). Nach Untersuchungen von Roslev und King (1993) zur Reduktion des Tetrazoliumsalzes XTT in Kulturen von *Methylosinus trichosporium* schien eine Umsetzung von Tetrazoliumfarbstoffen durch Methanotrophe proportional zu ihrer Stoffwechselaktivität möglich zu sein. Allerdings wird der in der genannten Untersuchung verwendete Farbstoff XTT zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert, das sich nicht in den Zellen ansammelt und daher eine spezifische Detektion der Aktivität einzelner Zellen im Boden nicht zulässt. Daher wurde zunächst eine Versuchsreihe zur Auswahl eines geeigneten Vitalfarbstoffs durchgeführt (Kapitel 4.1.1). Diese ergab, dass eine quantitative Färbung von Methanotrophen weder mit verschiedenen Tetrazoliumfarbstoffen noch mit 6-CFDA möglich war. Trotz verlängerter Färbereaktionen und Verwendung von Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase reichte die Stoffwechselaktivität der Methanotrophen nicht aus, um für den mikroskopischen Nachweis ausreichend Farbstoff in den Zellen anzusammeln. Ähnliche Ergebnisse erhielten Roslev und King (1993) in Untersuchungen zur Wiederaufnahme der Stoffwechselaktivität von Methanotrophen nach Hungerperioden bei Vitalfärbungen mit den Tetrazoliumsalzen CTC und XTT. Der Umsatz dieser Farbstoffe durch die untersuchten Stämme war unterschiedlich intensiv: Stoffwechselaktive Zellen eines nicht sporenbildenden Isolates setzten CTC nicht in nachweisbarer Menge um, während parallel behandelte Kulturen von *Methylosinus trichosporium* einen mikroskopisch nachweisbaren Umsatz aufwiesen. Auch in Untersuchungen von Bowman *et al.* (1993) mit dem Tetrazoliumsalz TTC (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid) waren die Ergebnisse stammspezifisch unterschiedlich. Von 16 untersuchten Methanotrophen reduzierten *Methylomonas* und *Methylococcus* Stämme das TTC zum Teil, die Typ II Stämme der Gattungen *Methylocystis* und *Methylosinus* reduzierten dagegen kein TTC.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und die Ergebnisse anderer

Autoren verdeutlichen, dass bei einer Vitalfärbung von Methanotrophen in ihrem natürlichen Habitat nur eine teilweise Anfärbung der aktiven Zellen zu erwarten ist. Ihre Detektion könnte daher mit dieser Methode nicht quantitativ erfolgen. Gerade Vergleiche der *in-situ* Aktivität von Typ I und Typ II Methanotrophen könnten bei Verwendung von Tetrazoliumsalzen zu falschen Rückschlüssen führen, da die Umsetzung des Vitalfarbstoffs durch Vertreter der einen Familie besser erfolgte als durch Vertreter der anderen (Bowman *et al.* 1993).

Ein zusätzliches Problem der Vitalfärbungen war die Anreicherung des Farbstoffs im Zellinneren. In den Färbeansätzen traten häufig Formazankristalle auf, die nicht eindeutig einzelnen Zellen zuzuordnen waren (Kapitel 4.1.1). Die speziell mit CTC (5-cyano-2,3-ditoly Tetrazoliumchlorid) auftretenden unförmigen Kristalle wurden in ähnlicher Form auch von Swope und Flickinger (1996) für *Escherichia coli*-Zellen beobachtet. Durch dieses Phänomen war eine eindeutige Zuordnung von Reduktionsaktivität zu einzelnen Zellen nicht mehr möglich. Durch die nicht quantitative Umsetzung und die nicht eindeutige Zuordnung von Farbstoff zu Zelle war die Vitalfärbung für Untersuchungen der Aktivität der Methanotrophen im natürlichen Habitat nicht geeignet. Um zumindest eine spezifische Detektion vegetativer Zellen in Umweltproben zu erreichen, wurde die Verwendung von Antikörpern in Erwägung gezogen.

#### **5.2.2.2. Spezifische Detektion von Methan oxidierenden Bakterien in Umweltproben**

Für eine genauere Beobachtung der Populationsdynamik einer Bakteriengruppe ist die spezifische Detektion einzelner Zellen in Umweltproben vorteilhaft, da dadurch Kultivierungsschritte und die damit verbundenen Fehlerquellen vermieden werden. Dieser direkte Nachweis von Zellen hat gegenüber DNA-Extraktionen den Vorteil, dass nur intakte Zellen und keine freie DNA detektiert werden. Zusätzlich kann beim direkten Nachweis von Zellen über die Zellform oder durch Markierung der Stoffwechselaktivität zwischen vegetativen Zellen und Ruhestadien unterschieden werden. Ein solcher spezifischer Nachweis wäre z.B. mit Antikörpern möglich.

Für ein Isolat Methan oxidierender Bakterien aus der Rhizoplane von Reiswurzeln wurden bereits polyklonale Antikörper entwickelt und zum Nachweis dieses Isolats

an und in der Reisswurzel erfolgreich eingesetzt (Gilbert *et al.* 1998). Für Untersuchungen zur Dynamik oder Dominanz der beiden Familien Methan oxidierender Bakterien wären allerdings Antikörper nötig, die diese beiden Familien umfassend, aber spezifisch detektieren. Für ihre Entwicklung wären Immunisierungen mit verschiedenen Stämmen der Methanotrophen notwendig. Allerdings wurde während der Untersuchungen zur Vitalfärbung von Methan oxidierenden Bakterien festgestellt, dass alle verwendeten Kulturen (sowohl Typ I als auch Typ II Methanotrophe) nicht rein waren. Eine Antikörper-Produktion auf Basis dieser Kulturen würde demnach nicht zu spezifischen Antikörpern für Methanotrophe führen, sondern auch die unbekannte Verunreinigung mit detektieren. Daher war die Verwendung von Antikörpern für die spezifische Detektion der Methanotrophen in Umweltproben nicht möglich.

Ein Vergleich mit früheren Untersuchungen von Kulturen Methan oxidierender Bakterien zeigte, dass sich die ungewöhnlichen Eigenschaften der hier verwendeten Kulturen (Kapitel 4.1.2) tatsächlich auf Begleitorganismen zurückführen lassen. Die in den hier dargestellten Untersuchungen nachgewiesenen "sehr kleinen Stäbchen" und durchsichtigen Kolonien der Verunreinigung ähnelten von anderen Autoren beobachteten Begleitorganismen der Methanotrophen. Namsaraev und Zavarzin (1972) beschrieben z.B. einen Stamm sehr kleiner beweglicher Stäbchen, der in Exkreten eines von ihnen isolierten *Methylosinus trichosporium* Stammes wuchs. Diese Stäbchen traten immer in den Sekretionen dieses *Methylosinus* Stammes auf und wuchsen nicht mit Methan oder Methanol. Sie wurden der Familie Pseudomonaceae zugeordnet. Weiterhin ist die von diesen Autoren gemachte Beobachtung interessant, dass diese kleinen Stäbchen zwar immer in der Kultur auftraten, aber nur einen kleinen Anteil der Biomasse ausmachten. Eine solche Verunreinigung liesse sich mit den in dieser Arbeit angewandten Verfahren der DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation der Kulturen nicht nachweisen, da die DNA der Begleitorganismen durch die grosse Menge der DNA methanotropher Zellen überlagert würde.

Auch in Untersuchungen mit Wurzel-assoziierten Methanotrophen wurden „Begleitorganismen“ gefunden. Calhoun und King (1998) beschrieben, dass ihre Anreicherungen aus stabilen Konsortien zweier Organismen typen bestanden, von denen nur einer Methan oxidierte. Diese „Begleitorganismen“ wurden als zum Teil nicht mikroskopisch nachweisbar beschrieben, wuchsen aber mit verschiedenen



organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle (Fettsäuren, Aminosäuren, Zucker und Methanol). In einigen dieser Kulturen wurde der Begleitorganismus von den Autoren als *Hyphomicrobium* eingeordnet. Ein weiteres Beispiel für „Begleitorganismen“ der Methan oxidierenden Bakterien wurde von Escoffier *et al.* (1997) in Versuchen zur Zellzahlbestimmung in Boden aufgeführt. Diese Autoren verwiesen dabei auf Untersuchungen von Whittenbury *et al.* (1970a), bei denen Probleme mit Verunreinigungen methanotropher Kulturen durch kaum sichtbare Kolonien von aktiv beweglichen, kleinen, gram-negativen Stäbchen auftraten, die kein Methan oxidierten. Auch diese Beschreibung ähnelt den in den hier dargestellten Untersuchungen gefundenen Bakterien und weist darauf hin, dass es sich hier nicht um ein neues Problem handelt.

Auch das Wachstum von Methanotrophen mit anderen Kohlenstoff- und Energiequellen als C<sub>1</sub>-Verbindungen wurde in einigen Charakterisierungen nicht vollkommen ausgeschlossen. Green (1992) beschrieb z.B. langsames Wachstum (innerhalb von 3 Wochen bei 30°C) von *Methylomonas methanica* mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und verwies dabei auf Beobachtungen von Zhao und Hanson (1984), deren *Methylomonas* 761H Stamm auf Glucose mit Caseinhydrolysat wuchs. Für *Methylococcus capsulatus* wurde eine Assimilation von Glucose und Fructose nachgewiesen (Eccleston und Kelly 1973) und auch der aus einem Feuchtgebiet isolierte methanotrophe Stamm WP12 assimilierte Glucose unter anaeroben Bedingungen ohne Zugabe von Methan (Roslev und King 1995). Diese Beobachtungen sind ein Hinweis darauf, dass Methan oxidierenden Bakterien ein bedingtes Wachstum mit komplexen Kohlenstoffverbindungen möglich ist. Dies könnte das hier beobachtete Wachstum der untersuchten Kulturen auf Komplexmedien teilweise erklären. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass die in allen Kulturen nachgewiesenen "sehr kleinen Stäbchen" einer nicht-methanotrophen Gattung angehören (siehe oben). Somit konnte nicht sichergestellt werden, dass bei der Verwendung der zur Verfügung stehenden Kulturen Methan oxidierender Bakterien für die Antikörperproduktion wirklich spezifische Antikörper gewonnen werden. Daher wurde stattdessen die Methode der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) für Methanotrophe angepasst, die neben dem spezifischen Nachweis einer Bakteriengruppe auch eine begrenzte Aussage über ihren Aktivitätszustand zulässt.

### 5.2.2.3. Anpassung von FISH für den spezifischen *in-situ* Nachweis von Typ I und Typ II Methanotrophen

Um eine spezifische Detektion einzelner Zellen der beiden Familien methanotropher Bakterien im Boden und an den Reisswurzeln zu ermöglichen, wurde die Methode der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) für Methanotrophe angepasst. Diese Methode bietet gegenüber der Detektion mit Antikörpern den Vorteil, dass auch bisher nicht kultivierte Arten detektiert werden können (Amann *et al.* 1995, Wagner *et al.* 1995). Für ein helles Signal und damit die Möglichkeit der mikroskopischen Detektion der hybridisierten Zellen ist ein hoher Ribosomengehalt notwendig. In früheren Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass nur aktive Zellen einen ausreichend hohen Ribosomengehalt haben und damit durch FISH nachgewiesen würden. FISH würde somit nicht nur die spezifische Detektion, sondern gleichzeitig eine Aussage über den Aktivitätszustand der Zelle *in-situ* ermöglichen. Untersuchungen an verschiedenen Bakterien zeigten allerdings, dass der Ribosomengehalt nicht linear mit der Zellaktivität abnimmt (Roslev und King 1995, Oda *et al.* 2000). Ein Sondersignal kann daher nicht direkt mit Zellaktivität gleichgesetzt werden, gibt aber dennoch einen Hinweis auf das Vorliegen der Zellen in vegetativer Form und damit indirekt auf den Zustand der Population *in-situ*.

Bisher war ein spezifischer Nachweis einzelner Zellen der beiden Familien Methanoxidierender Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) nicht möglich. Die bekannten Oligonukleotidsonden waren entweder zu spezifisch, d.h. sie markierten nur eine Gattung einer Familie oder zu unspezifisch, d.h. sie detektierten auch nicht methanotrophe Bakterien (Tsien *et al.* 1990, Brusseau *et al.* 1994, Holmes *et al.* 1995, Bourne *et al.* 2000). Die in dieser Arbeit entwickelten und verwendeten Sonden (Anhang 1) zeigten dagegen eine hohe Spezifität für die jeweilige gesamte Familie der Methanotrophen. Sie zeigten auch Übereinstimmung zu verschiedenen Sequenzen nicht kultivierter Methanotropher der jeweiligen Familien, wie ein Vergleich mit der Sequenzdatenbank EMBL ergab. Auch die Sequenzen von etwa 30 aus verschiedenen Habitaten isolierten Typ II Stämmen waren identisch zu den Sequenzen der Sonden M $\alpha$ 450 und M $\alpha$ 465, so dass auch diese Stämme detektiert würden (J. Heyer und P. Dunfield, persönliche Mitteilung).

Die Spezifität der Sonden wurde auch an einem überraschenden Fall deutlich: Die Hybridisierung von *Methylobacter whittenburyi*, dem Typstamm der Typ I Gattung, ergab ein Signal mit Typ II spezifischen, nicht aber mit Typ I spezifischen Sonden. Auch in PCR-Ansätzen reagierte diese Art immer wie ein Typ II Methanotropher. Nach partieller Sequenzierung der 16S rDNA konnte dieser Stamm der Gattung *Methylocystis* (Typ II) zugeordnet werden. Bereits Bourne *et al.* (2000) beschrieben Probleme mit *Methylobacter whittenburyi* in Hybridisierungen, in denen dieser Stamm mit gattungsspezifischen Sonden nicht hybridisierte. Überprüfungen der NCIMB ergaben, dass alle Stammkonserven von *Methylobacter whittenburyi*, bis zurück zu dem von Whittenbury eingereichten Originalstamm, das gleiche Ergebnis ergaben: Höchste Ähnlichkeit zur Gattung *Methylocystis* (P. N. Green, NCIMB, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse basierten sowohl auf Sequenzierungen der 16S rDNA als auch auf morphologischen Charakterisierungen. Sie führten zu der Annahme, dass bei der NCIMB bereits der falsche Stamm eingereicht und von dort aus an andere Stammsammlungen weitergegeben worden war. Die NCIMB hat bisher keinen *Methylobacter whittenburyi* Stamm aus anderen Sammlungen erhalten können und den Verkauf der Kultur eingestellt. Für die weitere Entwicklung der Typ I spezifischen Sonden wurde diese Kultur daher nicht mehr verwendet.

Die Spezifität der Sonden reichte nicht nur zur Unterscheidung der Familien Methan oxidierender Bakterien aus, sondern auch zur Abtrennung nicht-methanotropher Arten, zu deren Sequenzen die Sonden mindestens 2 Fehlpaarungen aufwiesen. Auch in FISH mit nicht-methanotrophen Referenzstämmen konnte diese Spezifität erreicht werden (Anhang 1).

Ein Vorteil der für die Anwendung ausgewählten Sonden Mx450 und My85+704 war ihre hohe Signalintensität in FISH, die der der universellen Eubakteriensonde Eub338 vergleichbar war. Dies könnte auf die Faltung des 16S rRNA-Moleküls im intakten Ribosom zurückzuführen sein, die zu Bereichen unterschiedlicher Bindungseffizienz für Sonden führt. Die Positionen der ausgewählten Sonden lagen in Bereichen guter Sondenbindungseffizienz (Fuchs *et al.* 1998). Die Signalintensität der Sonden erlaubte auch ihre Anwendung in Proben mit Autofluoreszenz, wie z.B. Reisswurzeln, so dass in dieser Arbeit die *in-situ* Dominanz von Typ I oder Typ II über FISH bestimmt werden konnte.

#### 5.2.2.4. Untersuchungen zur *in-situ* Dominanz von Typ I oder II im Mikrokosmos mit FISH

Trotz der geringen Zellzahl methanotropher Bakterien im Vergleich zur Gesamtzahl der mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbten Zellen, ergaben die Zählungen nach *in-situ* Hybridisierung Hinweise auf eine *in-situ* Dominanz der Typ II Methanotrophen im Mikrokosmenversuch (Kapitel 4.2.7). Diese Dominanz trat in allen Kompartimenten auf und hielt über die gesamte Vegetationsperiode an. Typ I Methanotrophe erreichten nur in der Rhizoplane Anteile von 50 bis 70% an der Gesamtpopulation der Methanotrophen (Tabelle 4.4). Diese erhöhte Anzahl der Typ I Methanotrophen an der Wurzel verdeutlicht, dass die Reisswurzeln nicht nur für die Aufrechterhaltung der Grösse der Population (Kapitel 4.2.5), sondern auch ihrer Diversität im Reisfeldboden notwendig sind.

Die beobachtete Dominanz von Typ II Methanotrophen im Mikrokosmos bestätigte Resultate früherer, auf Kultivierungstechniken basierender Untersuchungen. In diesen wurden aus höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen von MPN-Ansätzen aus Reisswurzeln oder Reisfeldboden Typ II Stämme isoliert (Gilbert und Frenzel 1998, Bodelier et al. 2000a, van Bodegom 2000). Der Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Zählungen mit FISH und der auf Kultivierung basierenden Resultate anderer Autoren zeigte, dass für die Methan oxidierenden Bakterien durch die Kultivierung keine Verfälschung der Ergebnisse bezüglich der relativen Zellzahlen der Familien eintrat.

Die in den Mikrokosmen beobachtete Dominanz der Typ II Methanotrophen über die gesamte Vegetationsperiode im Vergleich zu eher wechselnden Zellzahlen der Typ I Methanotrophen wies auf eine unterschiedliche Anpassung der beiden Familien an ihre Umwelt hin. Möglicherweise reagieren Typ I Methanotrophe stärker auf Änderungen des Sauerstoffangebots durch die Reisswurzeln, das sich mit dem Alter des Wurzelabschnitts und mit dem Wurzeltyp ändert (Flessa und Fischer 1992). Allerdings ist die Literatur bezüglich der Selektion für Typ I oder Typ II durch verschiedene Methan-:Sauerstoffverhältnisse nicht eindeutig. In Versuchen mit gegenläufigen Gradienten für Methan und Sauerstoff fanden Amaral und Knowles (1995), dass Typ I Methanotrophe bevorzugt bei niedrigen Methan- und hohen Sauerstoffkonzentrationen wuchsen, während Typ II Methanotrophe das umgekehrte Verhältnis bevorzugten. Im Gegensatz dazu wurde in

Versuchen mit Reinkulturen methanotropher Bakterien beider Familien kein Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen auf die Konkurrenz der Familien festgestellt, ihre apparenten  $K_M$ -Werte für Sauerstoff waren vergleichbar (Ren *et al.* 1997). Experimente mit wasserungesättigtem Reisfeldboden haben zudem gezeigt, dass in Inkubationen unter verschiedenen Mischungsverhältnissen von Methan und Sauerstoff nur die Änderung der Methankonzentration zur Selektion für eine der Familien führte, die Sauerstoffkonzentration aber keinen Einfluss auf die Dominanz der beiden Familien hatte (Henckel 2000). In diesen Ansätzen dominierten Typ I Methanotrophe bei niedrigen Methankonzentrationen, während beide Familien bei hohen Methankonzentrationen ungefähr zu 50 % zur Gesamtaktivität im Ansatz beitrugen.

Die Änderungen der Typ I Population im Reismikrokosmos traten parallel zur Abnahme der Ammoniumkonzentrationen im Porenwasser auf (Abbildung 4.6) und könnten daher auf einen stärkeren Einfluss der Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen auf Typ I Methanotrophe zurückgeführt werden. Ein positiver Einfluss von Ammonium auf Typ I Methanotrophe wurde bereits von Hanson und Hanson (1996) dargestellt und konnte für Reisfeldboden von Bodelier *et al.* (2000b) gezeigt werden, die eine verstärkte Zunahme der Biomasse von Typ I nach Ammoniumdüngung feststellten. Umgekehrt wurde von Graham *et al.* (1993) eine Dominanz von Typ II Methanotrophen unter stickstofflimitierenden Bedingungen gefunden. Diese Ergebnisse weisen auf einen Selektionsvorteil für Typ II Methanotrophe durch Stickstofflimitierung hin. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen des Mikrokosmenexperiments überein, in dem infolge hoher Methankonzentrationen und Stickstofflimitierung Typ II Methanotrophe dominierten. Im Feldexperiment war diese Dominanz allerdings nicht vorhanden. PCR-Amplifikationen mit höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen von MPNs der verschiedenen Kompartimente und Zeitpunkte ergaben sowohl mit dem 9 $\alpha$  als auch mit dem 10 $\gamma$  Primerset in allen Fällen ein Amplifikationsprodukt (Kapitel 4.3.6). Dies wies darauf hin, dass beide Familien der Methanotrophen im Reisfeld in ungefähr gleicher Zellzahl vorlagen, obwohl es hier ebenfalls zu einer Stickstofflimitierung kam. Die im Feldversuch im Vergleich zum Mikrokosmenexperiment geringeren Methankonzentrationen im Bodenporenwasser könnten ein Grund für eine weniger starke Selektion für Typ II gewesen sein.

Die Anzahl der im Mikrokosmenexperiment mit FISH detektierten Typ II Methano-

trophen blieb auch im undurchwurzten Boden über die gesamte Vegetationsperiode relativ konstant. Dies ist auffällig, da in diesem Kompartiment der für die Methanotrophen notwendige Sauerstoff nicht zur Verfügung stand. Da der Nachweis über FISH nur bei ausreichend hohem Ribosomengehalt möglich ist, müssten die fluoreszierenden Zellen zumindest in vegetativem Zustand vorgelegen haben. Diese Aufrechterhaltung eines hohen Ribosomengehalts würde eine schnelle Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ermöglichen, was mit den auch nach 92 Tagen Pflanzenwachstum noch detektierten Initialraten der potentiellen Methanoxidation im undurchwurzten Boden zusammenpassen würde (Kapitel 4.2.3). Die Methanotrophen könnten unter anaeroben Bedingungen in einen Ruhezustand übergegangen sein, wie er von Roslev und King (1994 und 1995) beschrieben wurde. Diese Autoren beobachteten nach Entfernen des Sauerstoffs aus dem Kultivierungsmedium nur eine geringe Bildung von Dauerstadien in den Kulturen Methan oxidierender Bakterien und die Zellen verringerten ihren Ribosomengehalt nur geringfügig. Im Gegensatz dazu wurde bei Entzug der Methanquelle unter aeroben Bedingungen ein verstärkter Übergang in die Dauerstadien festgestellt.

Die stabile Populationsstruktur und Anzahl der Typ II Methanotrophen über die gesamte Vegetationsperiode von Reis weist auf eine Anpassung dieser Familie hin, die zu einer geringeren Mortalität im Vergleich zur Typ I Population führt. Dadurch bliebe Typ II auch unter ungünstigen Umgebungsbedingungen dominant.

### **5.3. Diversität der Methan oxidierenden Bakterien im Reisfeld**

Neben dem Einfluss auf die Grösse einer Population können Änderungen der Umgebungsbedingungen auch ihre Diversität beeinflussen. Die hierdurch bedingte Dominanz einer Familie der Methanotrophen wurde im vorherigen Kapitel diskutiert. Aber auch die verschiedenen Gattungen einer Familie könnten unterschiedliche Anpassungen an das Leben im Reisfeld besitzen und somit zu verschiedenen Zeitpunkten in der Vegetationsperiode von Reis verstärkt aufwachsen. Zur näheren Charakterisierung der Entwicklung der Populationen und zur Darstellung möglicher Änderungen in der Dominanz einzelner Gattungen wurden in dieser Arbeit DNA-Amplifikationen mit verschiedenen Primersets

durchgeführt, denen eine Auftrennung der Produkte über denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) folgte. Dieses System wurde von Henckel *et al.* (1999) für den Nachweis von Methan oxidierenden Bakterien im Reisfeldboden entwickelt. Die Auftrennung gleichlanger DNA-Fragmente über DGGE lässt im Idealfall die Detektion von nur einem Basenaustausch in getrennten Banden zu (Muyzer *et al.* 1993) und ermöglicht daher auch die Detektion nahe verwandter Arten. Durch die Möglichkeit der Sequenzierung einzelner Banden ist nicht nur ihre Zuordnung zu vorhandenen Isolaten mit ähnlichem Bandenmuster möglich, sondern eine vollständige phylogenetische Analyse. Durch die Verwendung von Primern, die nicht ausschliesslich für bekannte Gruppen der Methyloprophen spezifisch waren (Kapitel 4.2.6 und 4.3.5), sollte eine breitere Detektion von Sequenzen ermöglicht werden. Dadurch könnten auch bislang nicht kultivierte Methanotrophe nachgewiesen und somit die Diversität dieser Bakteriengruppe im Reisfeld besser dargestellt werden.

### **5.3.1. Die Entwicklung der Typ II Methanotrophen über die Vegetationsperiode von Reis**

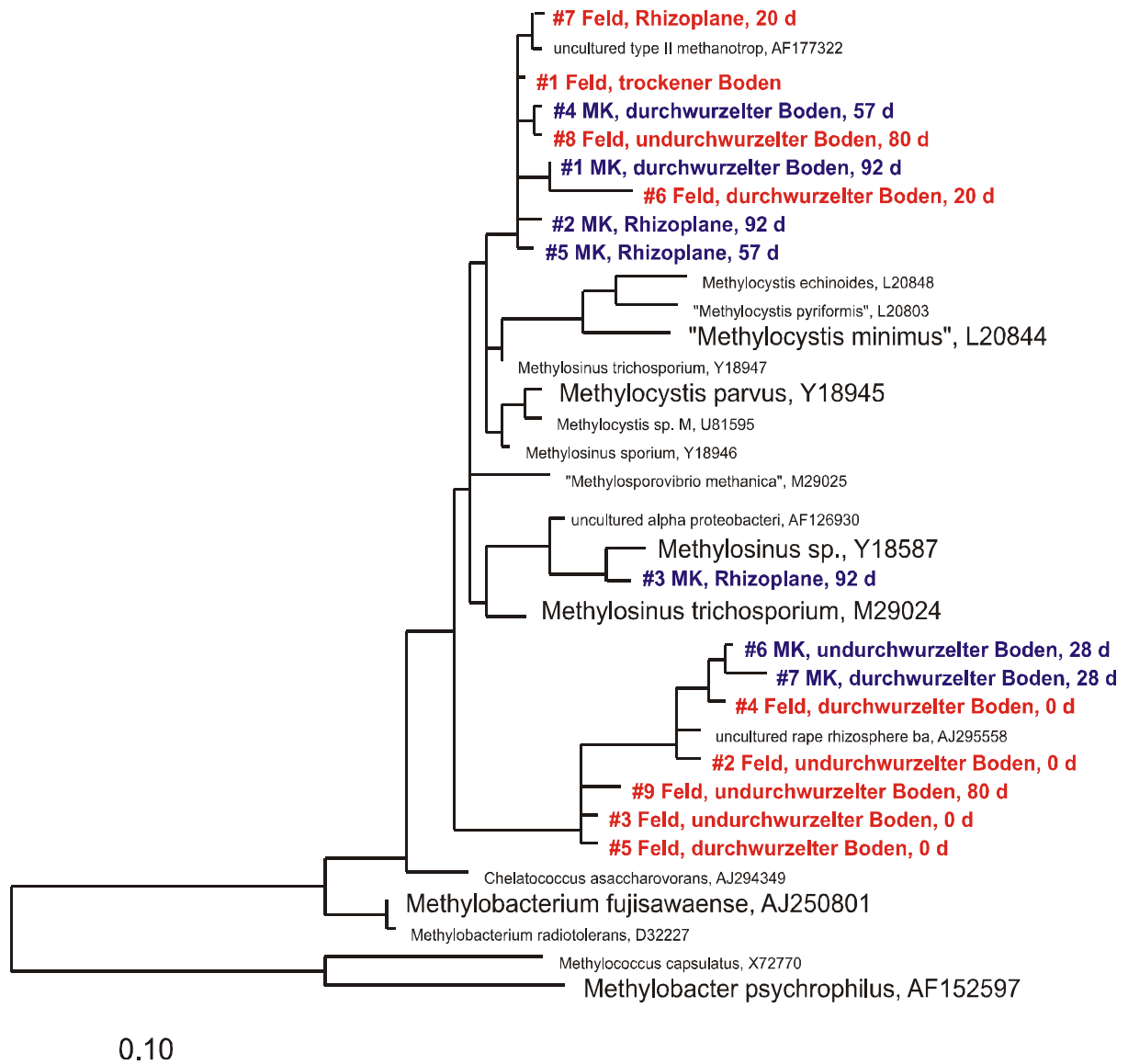
Die nach Amplifikation mit dem 9x Primerset für Serinweg Methyloprothe (inklusive Typ II Methanotrophe) erhaltenen DGGE-Bandenmuster für Mikrokosmos und Feld waren über alle Kompartimente räumlich und zeitlich konstant (Kapitel 4.2.6 und 4.3.5). Die Population der Typ II Methanotrophen schien daher von der Entwicklung der Pflanze und anderen Umgebungsbedingungen unabhängig zu sein. Allerdings könnte auch das Vorliegen vieler Zellen in Ruhestadien zu einem konstanten Bandenmuster führen, da die DNA-Extraktion und -Amplifikation nicht zwischen vegetativen Zellen und Dauerstadien unterscheidet (Amann und Ludwig 2000). Dagegen sprechen in den hier dargestellten Untersuchungen aber die zunehmende Zellzahl (MPN, Kapitel 4.2.5) und die über die gesamte Saison mögliche Detektion von Methanotrophen mit FISH (Kapitel 4.2.7).

Auch nach dem Absinken der *in-situ* Aktivität wurde kein Rückgang in Anzahl oder Intensität der Banden gefunden. Die Bandenmuster zeigten demnach keine Korrelation zur *in-situ* Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien. Im Gegensatz dazu wurde von Henckel *et al.* (1999) eine Zunahme der Bandenanzahl und -Intensität nach dem Einsetzen der Methanoxidation in Versuchen mit nicht

wassergesättigtem Reisfeldboden gefunden. Im Mikrokosmenexperiment wurde die erste Bodenprobe 10 Tage nach dem Überstauen des Bodens entnommen. Die Auswirkungen der ansteigenden Methankonzentration und einsetzender Methanoxidation im Boden auf die Population der Methanotrophen konnten daher nicht verfolgt werden. Im Feldexperiment wurden dagegen auch Bodenproben vor dem Fluten des Feldes entnommen und untersucht (trockener Boden). Der Vergleich der Bandenmuster zeigte aber auch in diesem Fall keine deutliche Zunahme in Anzahl oder Intensität der Banden (Kapitel 4.3.5). Die im Versuch von Henckel *et al.* (1999) eingestellten Bedingungen entsprachen nicht den im Reisfeld vorliegenden. Die im Vergleich zum Reisfeld und –mikrokosmos bessere Versorgung der Methanotrophen mit Sauerstoff und Methan im nicht wassergesättigten Boden könnten hier zu anderen Entwicklungen der Population geführt haben.

Die phylogentische Analyse der Sequenzen einzelner, nach 9 $\alpha$ -Amplifikation erhaltener DGGE-Banden zeigte, dass diese höchste Übereinstimmungen mit den bekannten Gattungen der Typ II Methanotrophen *Methylosinus* und *Methylocystis* aufwiesen (Abbildung 5.1). Die Sequenzen des Mikrokosmen- und des Feldexperiments zeigten zueinander und zu bereits bekannten Sequenzen aus Reisfeldboden (Henckel *et al.* 1999) die höchste Übereinstimmung. Nur zwei der untersuchten Banden des Mikrokosmenexperiments zeigten bei der phylogenetischen Analyse grösste Übereinstimmung zu einer Gruppe von nicht kultivierten Bakterien, die in verschiedenen Bodentypen gefunden wurde. Im Feldexperiment war diese Gruppe stärker vertreten. Der nächstverwandte isolierte und charakterisierte Bakterienstamm zu dieser Gruppe ist *Chelatococcus asaccharovorans*, der nicht auf methylo troph e Aktivität untersucht wurde (Auling *et al.* 1993). Ob sich hinter diesen Sequenzen eine bisher unbekannte Gruppe methylo tropher Bakterien verbirgt, kann ohne Isolierung und Charakterisierung eines Stammes nicht festgestellt werden. Das hier verwendete Primerset diente zur Amplifikation eines 16S rRNA-Gens und war nicht spezifisch für Methanotrophe. Die nachgewiesenen Sequenzen sind demnach nicht mit einer Stoffwechselfunktion verknüpft und lassen daher keine Rückschlüsse auf die Physiologie der Mikroorganismen zu.



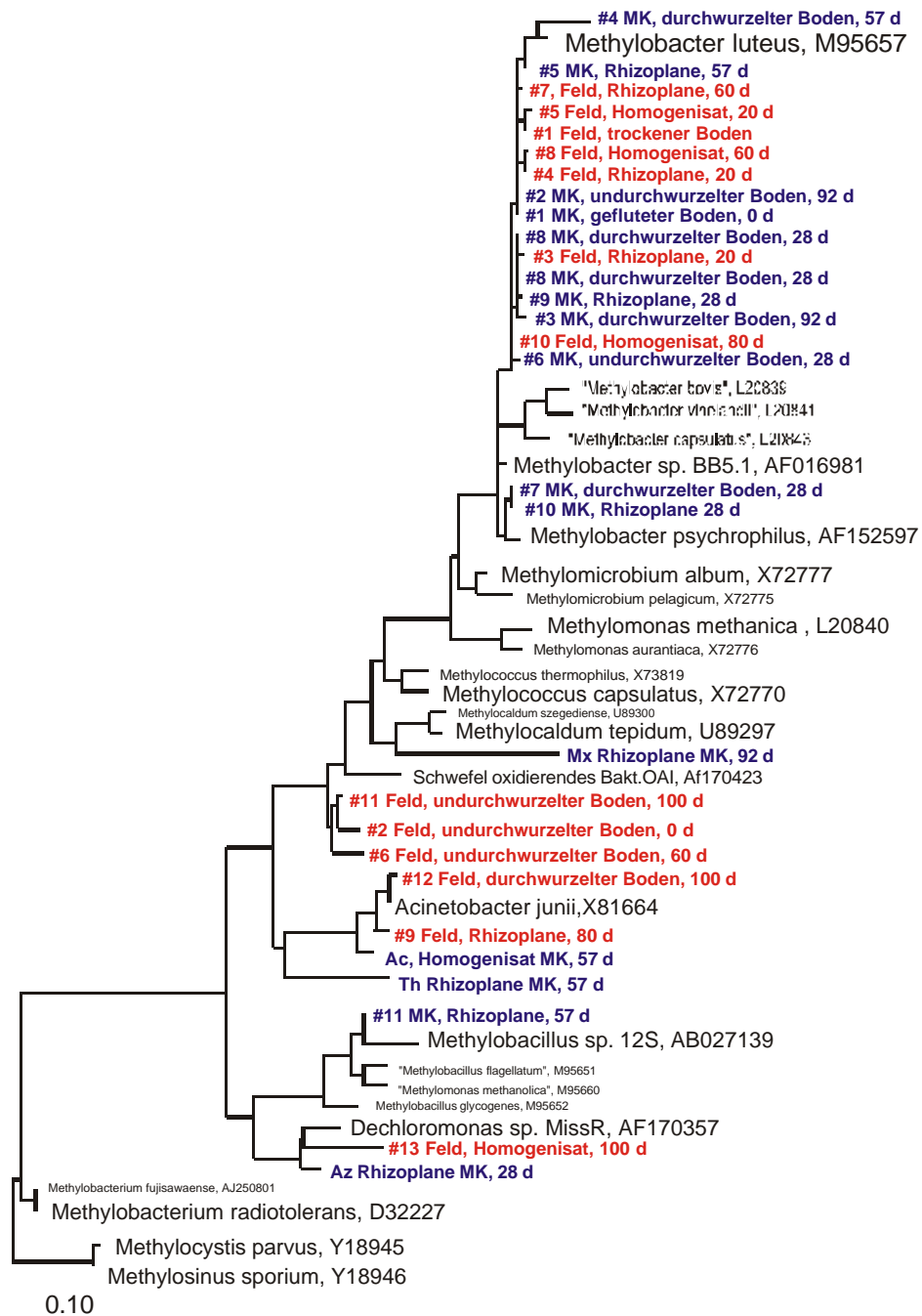


**Abbildung 5.1: Vergleich der aus einem Reisfeld und aus Reismikrokosmen erhaltenen Sequenzen nach 9 $\alpha$ -Amplifikation und Auftrennung über DGGE mit bekannten Sequenzen Typ II Methanotropher.** Die aus Mikrokosmenproben erhaltenen Sequenzen sind blau, die aus Feldproben rot markiert. Die Bezeichnung der Sequenzen dieser Arbeit setzt sich zusammen aus der Nummer der Bande (#) in Abbildung 4.12 (Mikrokosmos, MK) bzw. Abbildung 4.26 (Feld), Angaben zum Kompartiment aus dem die DNA extrahiert wurde und zum Alter der Reispflanze (d). Der Stammbaum wurde über Neighbour-Joining berechnet (Kapitel 3.4.8.8). Der Balken gibt die Distanz im Stammbaum für 0,1 Nukleotid-austausch in der Sequenz wieder.

Die DGGE-Bandenmuster mit den zugehörigen Sequenzen weisen durch ihre Konstanz auf eine geringere Reaktion der Typ II Methanotrophen auf die sich ändernden Umweltbedingungen hin.

### **5.3.2. Analyse der Populationsstruktur von Typ I Methanotrophen über die Vegetationsperiode von Reis**

Die nach 10 $\gamma$ -Amplifikation (RuMP Methylo trope, inklusive Typ I Methanotrophe) erhaltenen DGGE-Bandenmuster wiesen im Gegensatz zu den 9 $\alpha$ -Bandenmustern sowohl im Mikrokosmen- als auch im Feldversuch Änderungen zwischen den Kompartimenten und über die Vegetationsperiode auf (Kapitel 4.2.6 und 4.3.5). In den Feldproben wurden zudem mehr Banden gefunden als in Mikrokosmenproben. Diese Beobachtungen führten zu den Annahmen, dass sich erstens die Populationsstruktur der Typ I Methanotrophen über die Vegetationsperiode änderte und dass zweitens im Feld eine grössere Diversität der Population vorlag. Die Sequenzierung und phylogenetische Analyse verschiedener Banden zeigte allerdings, dass alle Sequenzen, die zu den Typ I Methanotrophen gruppierten, höchste Ähnlichkeit zur Gattung *Methylobacter* aufwiesen (Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2: Vergleich der aus einem Reisfeld und aus Reismikrokosmen erhaltenen Sequenzen nach 10g-Amplifikation und Auftrennung über DGGE.**

Die aus Mikrokosmenproben erhaltenen Sequenzen sind blau, die aus Feldproben rot markiert. Die Bezeichnung der Sequenzen dieser Arbeit setzt sich zusammen aus der Nummer der Bande (#) in Abbildung 4.10 (Mikrokosmos, MK) bzw. Abbildung 4.24 (Feld), Angaben zum Kompartiment aus dem die DNA extrahiert wurde und zum Alter der Reispflanze (d). Der Stammbaum wurde mit Neighbour-Joining berechnet (Kapitel 3.4.8.8). Der Balken gibt die Distanz im Stammbaum für 0,1 Nukleotidaustausch in der Sequenz wieder.

Es konnte keine Änderung in der Dominanz der verschiedenen Typ I Gattungen über die Vegetationsperiode oder in den verschiedenen Kompartimenten festgestellt werden. Da auch im Feld nur *Methylobacter* ähnliche Sequenzen gefunden wurden, war keine grössere Diversität für Typ I Methanotrophe im Feld nachzuweisen. Die hohe Anzahl von Sequenzen, die höchste Ähnlichkeit zu Gattungen nicht methanotropher Bakterien aufwiesen verdeutlichte, dass bei Verwendung dieses nicht strikt spezifischen Primersets eine Sequenzierung der Banden notwendig ist, bevor eine Aussage über die Populationsstruktur der RuMP Methyloprophen getroffen werden kann.

Die Gattung *Methylobacter* dominierte die Typ I Methanotrophen im Reisfeld und -mikrokosmos. Dies wurde auch in früheren Untersuchungen gefunden (Henckel *et al.* 1999, Bodelier *et al.* 2000b). Die Dominanz von *Methylobacter* weist auf einen wichtigen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Typ I Gattungen im Reisfeld hin. Diese Eigenschaft könnte die Ausbildung eines trockenungsresistenten Dauerstadiums sein, die es den *Methylobacter*-Arten ermöglicht, das Trockenlegen der Reisfelder im Winter und die Trocknung des Reisfeldbodens vor Verwendung in den Mikrokosmenexperimenten zu überstehen. Die von den Gattungen *Methylococcus* und *Methylomonas* gebildeten unreifen Cysten sind nicht trockenungsresistent. Für die Gattung *Methylomicrobium* sind keine Dauerstadien bekannt (Whittenbury *et al.* 1970b, Heyer 1990). Auch die im Reisfeld gefundenen Typ II Methanotrophen der Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* bilden trockenungsresistente Exosporen bzw. Lipidcysten aus und könnten somit ebenso wie *Methylobacter* das Austrocknen des Bodens überstehen.

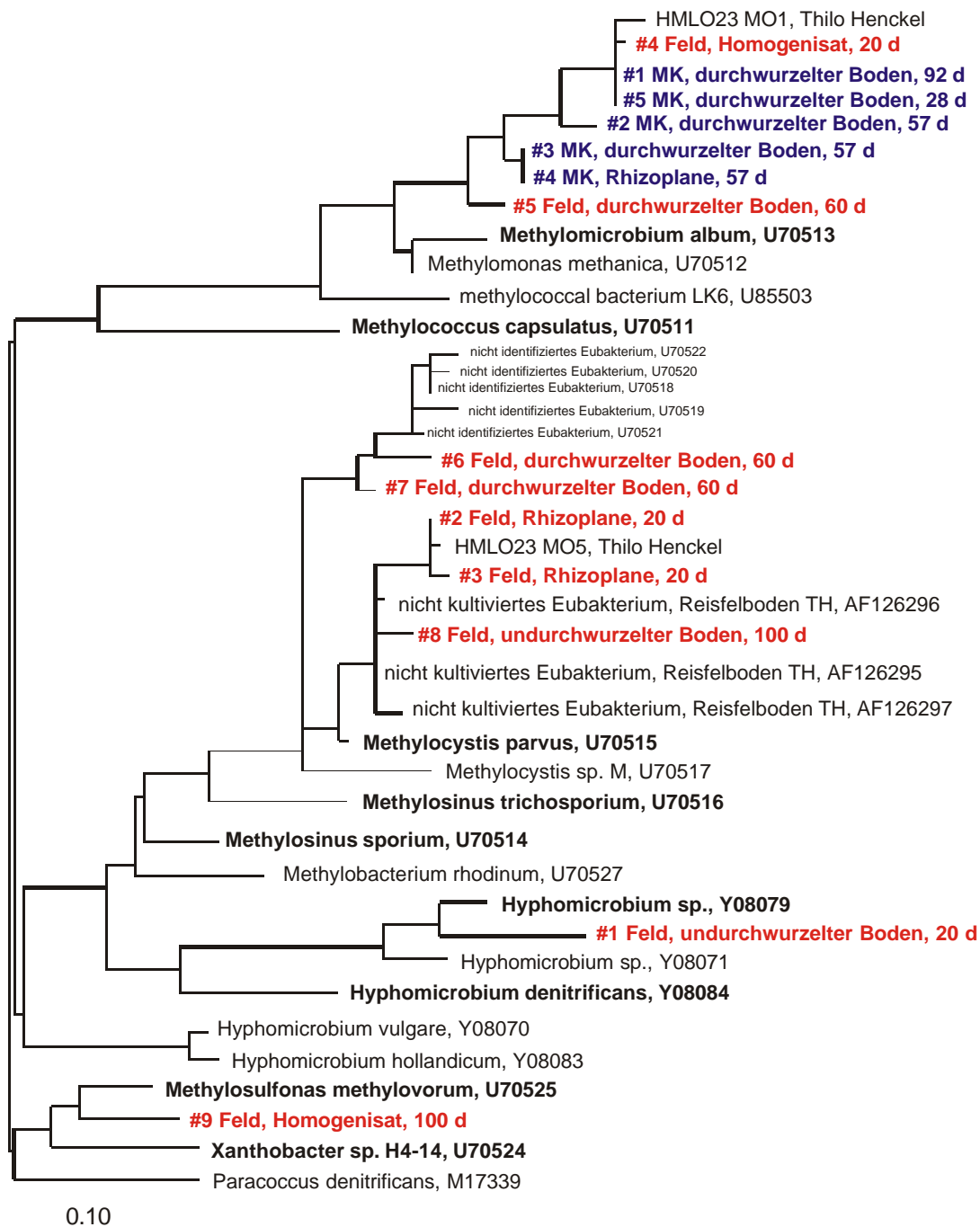
Die Auswirkungen der Bodentrocknung waren im Mikrokosmenversuch deutlich verstärkt gegenüber den natürlichen Bedingungen im Reisfeld, da der Boden bei Raumtemperatur zur Aufbewahrung vollständig durchgetrocknet wurde. Im Reisfeld tritt dagegen nach der Drainage eine oberflächliche Austrocknung ein, durch Witterung und Tag-/Nachtwechsel ist im Boden aber kontinuierlich eine höhere Restfeuchte vorhanden. Daher wurde im Reisfeld eine höhere Diversität der Typ I Methanotrophen erwartet als im Mikrokosmos, die aber nicht nachgewiesen wurde (Kapitel 4.3.5). Dies könnte auf die Verwendung der PCR-basierenden DGGE-Auftrennung zurückzuführen sein, die zum Nachweis der am besten amplifizierbaren und / oder numerisch dominanten Gene führt (Amann und Ludwig

2000). Diese Methode gäbe daher zwar eine Änderung der Dominanz verschiedener Gattungen wieder, aber nicht die vollständige Diversität der Population. In Untersuchungen mit anderen Methoden wie T-RFLP und Klonierungen wurden dagegen auch Sequenzen anderer Typ I Gattungen an Reiswurzeln nachgewiesen (H.-P. Horz, persönliche Mitteilung).

### **5.3.3. Vergleich der aus Mikrosomen- und Feldproben erhaltenen Sequenzen des Methanol-Dehydrogenase Gens *mxoF***

Die Amplifikationen des *mxoF*-Gens führten nur in den wurzelbeeinflussten Kompartimenten zu deutlich sichtbaren DGGE-Banden (Kapitel 4.2.6 und 4.3.5). Dies war darauf zurückzuführen, dass die Anzahl der Zielsequenzen nur in diesen Kompartimenten für eine starke Amplifikation ausreichte. Die Anzahl der Zielsequenzen eines bestimmten Gens in einer Probe ist proportional zur Anzahl der Zellen, die dieses Gen enthalten, da ein Gen in einer bestimmten Anzahl von Kopien pro Zelle vorliegt (Amann und Ludwig 2000). Die Zunahme der Bandenstärke wurde von Henckel *et al.* (1999) mit der Zunahme der Zielsequenzen in der Probe und darüber mit dem Wachstum der Bakterien verknüpft. Somit unterstützen die Ergebnisse der *mxoF*-Amplifikationen den bereits für die Zellzahl diskutierten positiven Effekt der Reiswurzel auf das Wachstum der Methan oxidierenden Bakterien (Kapitel 5.2.1). Der Schlüsselfaktor für das Wachstum der Methanotrophen im Reisfeld wäre daher die Versorgung mit Sauerstoff durch die Reiswurzel, gefolgt von der Verfügbarkeit von Stickstoffverbindungen. Die Kohlenstoff- und Energiequelle der Methanotrophen – Methan – war immer in ausreichender Menge verfügbar.

Ein Vergleich der aus den DGGE-Banden erhaltenen Sequenzen zeigte, dass im Mikrokosmos hauptsächlich Typ I Methanotrophe mit dem *mxoF*-Primerset detektiert wurden, während im Feld Sequenzen aller Gruppen methylotropher Bakterien nachzuweisen waren (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3: Vergleich der aus einem Reisfeld und aus Reismikrokosmen erhaltenen Sequenzen nach Amplifikation der  $\alpha$ -Untereinheit der Methanoldehydrogenase (*mxhF*).** Die aus Mikrokosmenproben erhaltenen Sequenzen sind blau, die aus Feldproben rot markiert. Die Bezeichnung der Sequenzen dieser Arbeit setzt sich zusammen aus der Nummer der Bande (#) in Abbildung 4.14 (Mikrokosmos, MK) bzw. Abbildung 4.28 (Feld), Angaben zum Kompartiment aus dem die DNA extrahiert wurde und zum Alter der Reispflanze (d). Der Stammbaum wurde mit Neighbour-Joining berechnet (Kapitel 3.4.8.8). Der Balken gibt die Distanz im Stammbaum für 0,1 Nukleotidaustausch in der Sequenz wieder.

Dieses Überwiegen der Typ I Methanotrophen im Mikrokosmos wies auf ihre Bedeutung im System trotz der numerischen Dominanz der Typ II Methanotrophen hin. Aus den Feldproben konnten mehr Sequenzen untersucht und daher ein besserer Überblick über die Diversität der Methyloprophen im Reisfeld gewonnen werden. Nach diesen Ergebnissen waren im Reisfeld verschiedene Gruppen der bekannten methano- und methyloprophen Bakterien, wie Typ I und II Methanotrophe, *Hyphomicrobium* und *Methylosulfonas*, in grosser Zahl im Boden vorhanden.

## 5.4. Abschliessende Betrachtungen

### 5.4.1. Übertragbarkeit der Ergebnisse des Mikrokosmenexperiments auf das Agraökosystem Reisfeld

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die im Modellsystem Mikrokosmos erhaltenen Daten auf das Agrarökosystem Reisfeld übertragbar waren. Es ist demnach möglich, ein solches Modellsystem für Untersuchungen zu nutzen, wenn die Randbedingungen, wie z.B. der verwendete Boden, die Reissorte und die Düngergaben sorgfältig gewählt werden.

Beide Familien der Methanotrophen konnten sowohl im Mikrokosmenexperiment als auch im Feldversuch in allen untersuchten Kompartimenten und über die gesamte Vegetationsperiode nachgewiesen werden. Die Typ I Methanotrophen wurden deutlich von der Gattung *Methylobacter* dominiert, während für die Typ II Methanotrophen die Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* nachgewiesen wurden. Beide detektierten Gattungen der Typ II Methanotrophen *Methylosinus* und *Methylocystis* bilden trocknungsresistente Dauerstadien aus, während bei den Typ I Methanotrophen nur die Gattung *Methylobacter* dazu in der Lage ist (Whittenbury *et al.* 1970b). Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass das Trocknen des Bodens zu einer Selektion innerhalb der Typ I Methanotrophen für die Gattung *Methylobacter* führte.

Zellzählungen über Kultivierung (MPN) zeigten, dass das Hauptwachstum der Methanotrophen während der ersten Wochen der Vegetationsperiode von Reis stattfand. Durch dieses Wachstum können Verluste der Population während des restlichen Jahres ausgeglichen werden. Die Rhizoplane konnte als wichtigster Ort

für die Erhaltung sowohl der Populationsgrösse als auch der Diversität der Methanotrophen identifiziert werden.

Mit Hilfe neuer familienspezifischer Sonden konnte durch FISH gezeigt werden, dass die bereits in früheren Untersuchungen gefundene Dominanz der Typ II Methanotrophen in Reismikrokosmen nicht auf Kultivierungseinflüsse, sondern auf die tatsächliche *in-situ* Dominanz dieser Familie zurückzuführen war. Allerdings war diese Dominanz auf das Mikrokosmensystem beschränkt, während im Feld beide Familien in ähnlicher Zellzahl vorlagen. Hier könnten die besonders hohen Methankonzentrationen im Bodenporenwasser der Mikrokosmen zu einer gegenüber dem Feld verstärkten Selektion für Typ II Methanotrophe geführt haben.

Auch die Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien wurde entscheidend durch die Reisswurzeln beeinflusst, was besonders im Mikrokosmenexperiment durch die striktere Trennung von durchwurzeltem und undurchwurzeltem Boden deutlich wurde. Diese erhöhte Aktivität der Methan oxidierenden Bakterien ist wahrscheinlich auf die diffusive Sauerstoffabgabe der Wurzeln zurückzuführen. Trotz dieser Sauerstoffzufuhr kam es aber zu einer Limitierung der Methanotrophen, die auf einen Mangel an Stickstoffverbindungen zurückgeführt werden konnte. Die Stickstoffdüngung ist demnach eine viel versprechende Möglichkeit zur Erhöhung der Methanoxiderationsrate und somit zur Verringerung der Methanemission im Reisfeld / -mikrokosmos.

#### 5.4.2. Ausblick

Die Sequenzen der familienspezifischen Oligonukleotidsonden könnten auch als Primer in PCR-Amplifikationen eingesetzt werden. Eine Kombination von FISH und PCR-basierenden Methoden, die eine nachfolgende Sequenzierung erlauben, könnte eine genauere Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft nicht nur im Reisfeld, sondern auch in anderen Ökosystemen ermöglichen. Allerdings wird mit den Typ II Sonden und dem in dieser Arbeit verwendeten Primerset 9 $\alpha$  eine neue Gattung Typ II Methan oxidierenderer Bakterien, *Methylocella* (Dedysh *et al.* 2000), nicht nachgewiesen. Um diese Gattung in die Charakterisierung mit einzuschliessen und eine Aussage über ihr Vorhandensein und eventuelle ökologische Relevanz im untersuchten System zu ermöglichen, wäre der Einsatz von zusätzlichen FISH-Sonden oder Primersets notwendig, die



für diese Gattung spezifisch sind (S. Dedysh, persönliche Mitteilung).

Die inzwischen verfügbaren Nachweismethoden für Methanotrophe würden auch eine genauere Untersuchung ihrer Populationsökologie und hier besonders der Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Gattungen ermöglichen. Die Gruppe der Methan oxidierenden Bakterien setzt sich aus mehreren Gattungen zusammen, die ohne bekannte spezielle Anpassungen an Umgebungsbedingungen um die Ressourcen Methan, Sauerstoff und leichtverfügbaren Stickstoff konkurrieren. Das parallele Auftreten verschiedener Gattungen im Reisfeld widerspricht dem "Exklusionsprinzip" bei der Konkurrenz um einfache Substrate. Allerdings weisen die beobachteten Änderungen der Typ I - bei gleichzeitig stabiler Typ II - Population auf unterschiedliche Überlebensstrategien der Familien der Methanotrophen hin. Weiterführende Untersuchungen könnten zeigen, ob Typ I Methanotrophe durch schnelles Wachstum veränderliche Umweltbedingungen ausnutzen, während Typ II durch eine hohe Zellzahl mit geringer Mortalität (aber niedrigerer Wachstumsrate) im System überleben. Verdrängungsversuche unter konstant gehaltenen, im Vergleich zu Versuchen mit sich ändernden Umweltbedingungen könnten diesbezüglich neue Einblicke ermöglichen. Zur Beobachtung der Entwicklungen könnten RNA-basierende Methoden verwendet werden, die auch eine Zuordnung der Aktivität zu bestimmten Gattungen erlauben. In Laborversuchen wäre auch die Gabe radioaktiv markierter Substrate und die nachfolgende Analyse von Zellbausteinen (z.B. phosphorylierte Fettsäuren oder DNA) möglich, um das Konkurrenzverhalten der Gattungen zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit angewandte Kombination von Prozessuntersuchungen und mikrobiologischen sowie molekularbiologischen Methoden könnte auch zur Untersuchung anderer Mikroorganismengruppen angewandt werden, da sie eine vielschichtige Charakterisierung der Lebensgemeinschaft zulässt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allen, L. H.** 1997. Mechanisms and rates of O<sub>2</sub> transfer to and through submerged rhizomes and roots via aerenchyma. Soil & Crop Science Society of Florida Proceedings **56**: 41-54
- Amann, R. und W. Ludwig.** 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. **24**: 555-565
- Amann, R., W. Ludwig, K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169
- Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1919-1925
- Amaral, J. A., und R. Knowles.** 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. FEMS Microbiol. Lett. **126**: 215-220
- Armstrong, W.** 1971. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. Physiol. Plant. **25**: 192-197
- Arth, I., und P. Frenzel.** 2000. Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: the detection of processes by a new multichannel electrode. Biol. Fertil. Soils **31**: 427-435
- Assmus, B.** 1995. In situ-Detektion von Bakterien aus Boden- und Gewässerhabitaten mit spezifischen Markierungen sowie optischen und zytometrischen Methoden. p. . In (ed.) . ,
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J. R. Lawrence, A. Hartmann.** 1995. In situ localization of *Azospirillum brasiliense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1013-1019
- Aulakh, M. S., R. Wassmann, H. Rennenberg, S. Fink.** 2000. Pattern and amount of aerenchyma relate to variable methane transport capacity of different rice cultivars. Plant Biol **2**: 182-194
- Auling, G., J.-H. Busse, T. Egli, T. El-Banna, E. Stackebrandt.** 1993. Description of the Gram-negative, obligately aerobic, nitrilotriacetate (NTA)-utilizing bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus asaccharovorans*, gen. nov., sp. nov.. System. Appl. Microbiol. **16**: 104-112
- Bender, M. und R. Conrad.** 1992. Kinetics of CH<sub>4</sub> oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH<sub>4</sub> mixing ratios. FEMS Microbiol. Ecol. **101**: 261-270
- Berthelet, M., L.G. Whyte, C. G. Geer.** 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. FEMS Microbiol. Letters **138**: 17-22
- Bilek, R. S., S. C. Tyler, R. L. Sass, F. M. Fisher.** 1999. Differences in CH<sub>4</sub> oxidation and pathways of production between rice cultivars deduced from measurements of CH<sub>4</sub> flux and delta c-13 of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Global Biogeochemical Cycles. **13**: 1029-1044

- Bodelier, P. L. E., A. G. Wijlhuizen, C. W. P. M. Blom, H. J. Laanbroek.** 1997. Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant Soil* **190**: 91-103
- Bodelier, P. L. E., H. Duyts, C. W. P. M. Blom, H. J. Laanbroek.** 1998. Interactions between nitrifying and denitrifying bacteria in gnotobiotic microcosms planted with the emergent macrophyte *Glyceria maxima*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 63-78
- Bodelier, P. L. E., A. P. Hahn, I. Arth, P. Frenzel.** 2000. Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice. *Biogeochemistry* **51**: 225-257
- Bodelier, P. L. E., P. Roslev, T. Henckel, and P. Frenzel.** 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* **403**: 421-424
- Bosse, U.** 1995. Methanoxidation in gefluteten Reisfeldern. PhD thesis. Phillips-Universität Marburg, Marburg/Lahn, Germany
- Bosse, U. und P. Frenzel.** 1997. Activity and distribution of CH<sub>4</sub> oxidizing bacteria in flooded rice microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1199-1207
- Bosse, U. und P. Frenzel.** 1998. Methane emissions from rice microcosms: the balance of production, accumulation and oxidation. *Biogeochemistry* **41**: 199-214
- Bosse, U., P. Frenzel, R. Conrad.** 1993. Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 123-134
- Bourne, D. G., A. J. Holmes, N. Iversen, J. C. Murrell.** 2000. Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 29-38
- Bowman, J.** 1999. The Methanotrophs - The Families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. In Dworkin, M. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer, New York
- Bowman, J. P., L. I. Sly, P. D. Nichols, A. C. Hayward.** 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 735-753
- Brosius, J. ., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, H. H. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**: 4801-4805
- Brusseau, G. A., E. S. Bulygina, R. S. Hanson.** 1994. Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 626-636
- Butterbach-Bahl, K., H. Papen, H. Rennenberg.** 1997. Impact of gas transport through rice cultivars on methane emission from rice paddy fields.. *Plant, Cell and Environment* **20**: 1175-1183
- Byrd, G. T., F. M. Fisher, R. L. Sass.** 2000. Relationships between methane production

and emission to lacunal methane concentrations in rice. *Global Biogeochem. Cycles* **14**: 73-83

**Cai, Z. C. und A. R. Mosier.** 2000. Effect of NH<sub>4</sub>Cl addition on methane oxidation by paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1537-1545

**Calhoun, A. und G. M. King.** 1998. Characterization of root-associated methanotrophs from three freshwater macrophytes - *Pontederia cordata*, *Sparganium eurycarpum*, and *Sagittaria latifolia*. *Appl. Envir. Microbiol.* **64**: 1099-1105

**Cassman, K. G., S. Peng, D. C. Olk, J. K. Ladha, W. Reichardt, A. Doberman, U. Singh.** 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crops Res.* **56**: 7-39

**Chanton, J. P., G. J. Whiting, N. E. Blair, C. W. Lindau, P. K. Bollich.** 1997. Methane emission from rice - stable isotopes, diurnal variations, and CO<sub>2</sub> exchange. *Global Biogeochem. Cyc.* **11**: 15-27

**Cicerone, R. J. und R. S. Oremland.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles* **2**: 299-327

**Conrad, R.** 1997. Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere. p. 27-44. *In* Helas, G., Slanina, J., and Steinbrecher, R. (Hrsg.) *Biogenic volatile organic carbon compounds in the atmosphere*. SBP Academic Publ., Amsterdam

**Conrad, R.** 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [review]. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 193-202

**Conrad, R., und M. Klose.** 1999. How specific is the inhibition by methyl fluoride of acetoclastic methanogenesis in anoxic rice field soil?. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 47-56

**Cook, K. L., und J. L. Garland.** 1997. The relationship between electron transport activity as measured by CTC reduction and CO<sub>2</sub> production in mixed microbial communities. *Microbial Ecology* **34**: 237-247

**Crutzen, P. J.** 1994. Global budget for non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases. *Environmental Monitoring & Assessment* **31**:

**Crutzen P.J.** 1991. Methane's sinks and sources.. *Nature* **350**: 380-381

**Dannenberg, S., und R. Conrad.** 1999. Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. *Biogeochemistry* **45**: 53-71

**Dannenberg, S., und R. Conrad.** 1999. Effect of rice plants on methane production and rhizospheric metabolism in paddy soil. *Biogeochemistry* **45**: 53-71

**Dedysh, S. N., W. Liesack, V. N. Khmelenina, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko, J. D. Semrau, A. M. Bares, N. S. Panikov, J. M. Tiedje.** 2000. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bags, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969

**Denier van der Gon, H. A. A., und N. van Breemen.** 1993. Diffusion-controlled transport of methane from soil to atmosphere as mediated by rice plants. *Biogeochemistry* **21**: 177-

190

**Denier van der Gon H.A.A., und H.-U. Neue.** 1996. Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants.. Biol. Fertil. Soils **22**: 359-366

**Dobermann, Gaunt, Neue, Grant, Adviento, Pampolino.** 1994. Spatial and temporal variability of ammonium in flooded rice fields. Soil Sci. Soc. Am. J. **58**: 1708-1717

**Dubey, S. K., und J. S. Singh.** 2000. Spatio-temporal variation and effect of urea fertilization on methanotrophs in a tropical dryland rice field. Soil Biol. Biochem. **32**: 521-526

**Dunfield, P. F., W. Liesack, T. Henckel, R. Knowles, R. Conrad.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type ii methanotroph. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1009-1014

**Eccleston, M., und D. P. Kelly.** 1973. Assimilation and toxicity of some exogenous C<sub>1</sub> compounds, alcohols, sugars and acetate in the methane oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus*. J. Gen. Microbiol. **75**: 211-221

**Eller, G. , S. Stubner, P. Frenzel.** 2000. Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. FEMS Microbiol. Lett., in press

**Enquete Kommission des deutschen Bundestages (Hrsg.).** 1990. Vorsorge zum Schutz der Erdatmosphäre, Economica, Karlsruhe

**Escoffier, S., J. Lemer, P. A. Roger.** 1997. Enumeration of methanotrophic bacteria in ricefield soils by plating and MPN techniques - a critical approach. European J. Soil Biol. **33**: 41-51

**Flessa, H., and W. R. Fischer.** 1992. Plant-induced changes in the redox potentials of rice rhizosphere. Plant Soil **143**: 55-60

**Frenzel, P., F. Rothfuss, R. Conrad.** 1992. Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. Biol. Fert. Soil **14**: 84-89

**Frenzel, P., U. Bosse, P. H. Janssen.** 1999. Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. Soil Biol. Biochem. **31**: 421-430

**Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwiipp, W. Ludwig, R. Amann.** 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of escherichia coli 16s rna for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4973-4982

**Gilbert, B.** 1997. Methanotrophe Bakterien in der Reiserhizosphäre. PhD thesis. Phillips-Universität Marburg, Marburg/Lahn, Germany

**Gilbert, B., und P. Frenzel.** 1995. Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. Biol. Fert. Soils **20**: 93-100

**Gilbert, B., und P. Frenzel.** 1998. Rice roots and CH<sub>4</sub> oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. Soil Biol. Biochem. **30**: 1903-1916

- Graham, D. W., J. A. Chaudhary, R. S. Hanson, R. G. Arnold.** 1993. Factors affecting competition between type-I and type-II methanotrophs in 2-organism, continuous-flow reactors. *Microb. Ecol.* **25**: 1-17
- Graham, E. T., und P. A. Joshi.** 1996. Plant cuticle staining with Bismarck brown Y and azure B or toluidine blue O before paraffin extraction. *Biotechnic & Histochemistry* **71**: 92-95
- Granli, T., O. C. Boeckman.** 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. Agricultural University of Norway, Norsk Hydro Research Centre, Porsgrunn, N
- Green, P. N.** 1992. Taxonomy of methylotrophic bacteria. p. 23-84. *In* Murrell, J. C., und Dalton, H. (Hrsg.) *Methane and methanol utilizers*. Plenum Press, New York
- Hanson, R. S., und T. E. Hanson.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471
- Hanson, R. S., A. I. Netrusov, K. Tsuji.** 1992. The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylomonas*, and *Methylosinus*. *In* Balows, A. et al. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin
- Henckel, T.** 2000. Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft im Reisfeld- und Waldboden. PhD thesis. Phillips-Universität Marburg, Marburg/Lahn, Germany
- Henckel, T., M. Friedrich, R. Conrad.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16s rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990
- Heyer, J.** 1990. *Der Kreislauf des Methans*. Akademieverlag, Berlin
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B.K. Chelm, J. M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711
- Holmes, A. J., N. J. P. Owens, J. C. Murrell.** 1995. Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. *Microbiology - UK* **141**: 1947-1955
- Holzappel-Pschorn, A., und W. Seiler.** 1986. Methane emission during a cultivation period from an Italian rice paddy. *J. Geophys. Res.* **91D**: 11803-11814
- Hütsch, B. W..** 1998. Sources and sinks of methane in German agroecosystems in context of the global methane budget. *Agribiological Research-Zeitschrift für Agrarbiologie Agrikulturchemie Ökologie* **51**: 75-87
- IPCC.** 1994. Radiative forcing of climate change and evaluation of the IPCC IS92 emission scenarios. Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, New York
- IRRI.** 1991. World rice statistics 1990. International Rice Research Institute, Philippinen

- Janssen, P. H., und P. Frenzel.** 1997. Inhibition of methanogenesis by methyl fluoride: studies on pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4552-4557
- Joergensen, L., und H. Degn.** 1983. Mass spectrometric measurements of methane and oxygen utilization by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 331-335
- Joux, F., P. Lebaron, M. Troussellier.** 1997. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 65-76
- Kaprelyants, A. S., und D. B. Kell.** 1993. Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: Flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3187-3196
- Khalil, M. A. K., R. A. Rasmussen, M. J. Shearer, R. W. Dalluge, L. X. Ren, C. L. Duan.** 1998. Measurements of methane emissions from rice fields in China. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **103**: 25181-25210
- Khalil, M. A. K., R. A. Rasmussen, M. J. Shearer, Z. L. Chen, H. Yao, and J. Yang.** 1998. Emissions of methane, nitrous oxide, and other trace gases from rice fields in china. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **103**: 25241-25250
- Kimura, M.** 1997. Sources of methane emitted from paddy fields. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **49**: 153-161
- King, G. M.** 1994. Associations of methanotrophs with the roots and rhizomes of aquatic vegetation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3220-3227
- King, G. M.** 1990. Regulation by light of methane emissions from a wetland. *Nature* **345**: 513-515
- King, G. M., P. Roslev, and H. Skovgaard.** 1990. Distribution and rate of methane oxidation in sediments of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2902-2911
- Krüger, M.** 2000. Mikrobielle Regulation der CH<sub>4</sub>-Emission aus Reisfeldern. PhD thesis. Philipps-Universität, Marburg/Lahn, Germany
- Krüger, M., P. Frenzel, R. Conrad.** 2001. Microbial processes influencing methane emission from rice fields. *Global Change Biol.* **7**: 49-64
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In* Stackebrandt, E., M. Goodfellow (Hrsg.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England
- Law, K. S., und E. G. Nisbet.** 1996. Sensitivity of the CH<sub>4</sub> growth rate to changes in CH<sub>4</sub> emissions from natural gas and coal. *J. Geophys. Res. - Atmospheres* **101**: 14387-14397
- Lulai, E. C., und W. C. Morgan.** 1992. Histochemical probing of potato periderm with neutral red, a sensitive cytofluorochrome for the hydrophobic domain of suberin. *Biotechnic & Histochemistry* **67**: 185-195
- Marsh, P., N. Z. Morris, E. M. H. Wellington.** 1998. Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 351-363

- Matheson, L. J., L. L. Jahnke, R. S. Oremland.** 1997. Inhibition of methane oxidation by *Methylococcus capsulatus* with hydrochlorofluorocarbons and fluorinated methanes. Appl. Envir. Microbiol. **63**: 2952-2956
- Milich, L.** 1999. The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused?. Global Environmental Change - Human & Policy Dimensions **9**: 179-201
- Miller, L. G., C. Sasson, R. S. Oremland.** 1998. Difluoromethane, a new and improved inhibitor of methanotrophy . Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4357-4362
- Minami, K., und H.-U. Neue.** 1994. Rice paddies as a methane source.. Climatic Change **27**: 13-26
- Minoda, T., M. Kimura, and E. Wada.** 1996. Photosynthates as dominant source of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in soil water and CH<sub>4</sub> emitted to the atmosphere from paddy fields. Journal of Geophysical Research-Atmospheres **101**: 21091-21097
- Murrell, J. C.** 1992. Genetics and molecular biology of methanotrophs. FEMS Microbiol. Rev. **88**: 233-248
- Murrell, J. C., I. R. McDonald, D. G. Bourne.** 1998. Molecular methods for the study of methanotroph ecology [review]. FEMS Microbiol. Ecol. **27**: 103-114
- Muyzer, G., E. C. DeWaal, A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 695-700
- Namsaraev, B. B., und T. A. Zavarzin.** 1972. Trophic relationships in a methane-oxidizing culture. Microbiology **41**: 887-892
- Neue, H. U.** 1997. Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. Soil Use Manag. **13**: 258-267
- Nybroe, O.** 1995. Assessment of metabolic activity of single bacterial cells - new developments in microcolony and dehydrogenase assays. FEMS Microbiol. Ecol. **17**: 77-83
- Oda, Y., S.-J. Slagman, W. G. Meijer, L. J. Forney, and J. C. Gottschal.** 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. FEMS Microbiol. Ecol. **32**: 205-213
- Oliver, J. D.** 1993. Formation of viable but unculturable cells. In Kjelleberg, S. (Hrsg.) Starvation in Bacteria. Academic Press, New York
- Oremland, R. S., und C. W. Culbertson.** 1992. Evaluation of methyl fluoride and dimethyl ether as inhibitors for aerobic methane oxidation. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2983-2992
- Peters V., und R. Conrad.** 1996. Sequential reduction processes and initiation of methane production upon flooding of oxic upland soils.. Soil Biol. Biochem. **28**: 371-382
- Ponnamperuma, F. N.** 1972. The chemistry of submerged soils. Adv. Agronomy **24**: 29-96



- Pyle, B. H., S. C. Broadaway, G. A. McFeters.** 1995. Factors affecting the determination of respiratory activity on the basis of cyanoditoly tetrazolium chloride reduction with membrane filtration. *Appl. Envir. Microbiol.* **61**: 4304-4309
- Raimbault, M.** 1975. Étude de l'influence de l'acétylène sur la formation biologique du méthane dans un sol de rizière. *Ann. Microbiol.* **126A**: 247-258
- Ren, T., J. A. Amaral, R. Knowles.** 1997. The response of methane consumption by pure cultures of methanotrophic bacteria to oxygen. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 925-928
- Rodriguez, G. G., D. Phipps, K. Ishiguro, H. F. Ridgway.** 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1801-1808
- Roslev, P., und G. M. King.** 1993. Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2891-2896
- Roslev, P., und G. M. King..** 1995. Aerobic and anaerobic starvation metabolism in methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1563-1570
- Roslev, P., N. Iversen, K. Henriksen.** 1997. Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**: 874-880
- Rotthauwe, J. H., K. P. Witzel, W. Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker - molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**: 4704-4712
- Rowe, R., R. Todd, J. Waide.** 1977. Microtechnique for most-probable-number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 675-680
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Sass, R. L., F. M. Fisher, F. T. Turner, M. F. Jund.** 1991. Methane emission from rice fields as influenced by solar radiation, temperature, and straw incorporation. *Global Biogeochem. Cycles* **5**: 335-350
- Sass R., R. Conrad, K. Minami, H. U. Neue, H. Rennenberg.** 1992. Exchange of methane and other trace gases in rice cultivation. *Ecological Bulletins* **42**: 199-206
- Schaule, G., H.-C. Flemming, H. F. Ridgway.** 1993. Use of 5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3850-3857
- Scherer, H. W., und Y. Zhang.** 1999. Studies on the mechanisms of fixation and release of ammonium in paddy soils after flooding. I. Effect of iron oxides on ammonium fixation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **162**: 593-597
- Schneiders, M., und H. W. Scherer.** 1998. Fixation and release of ammonium in flooded rice soils as affected by redox potential. *European Journal of Agronomy* **8**: 181-189
- Schnell, S., und G. M. King.** 1994. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of

atmospheric methane consumption in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3514-3521

**Schnell, S., und G. M. King.** 1995. Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 285-294

**Schütz, H., W. Seiler, R. Conrad.** 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* **7**: 33-53

**Schütz, H., W. Seiler, R. Conrad.** 1990. Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. *Biogeochemistry* **11**: 77-95

**Shishkoff, N.** 1989. Zoospore encystment pattern and germination on onion roots and colonization of hypodermal cells by *Pythium-coloratum*. *Canadian Journal of Botany* **67**: 258-262

**Smith, J. J., und G. A. McFeters.** 1996. Effects of substrates and phosphate on INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* **80**: 209-215

**Smith, J. J., und G. A. McFeters.** 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods* **29**: 161-175

**Smith, M. M., und M. E. McCully.** 1978. Enhancing aniline blue fluorescent staining of cell wall structures. *Stain Technology* **53**:

**Sprott, G. D., K. F. Jarrell, K. M. Shaw, R. Knowles.** 1982. Acetylene as an inhibitor of methanogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2453-2462

**Steudler, P. A., R. D. Bowden, J. M. Melillo, J. D. Aber.** 1989. Influence of nitrogen fertilization on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* **341**: 314-316

**Strunk, O. und W. Ludwig.** 1996 (posting date). ARB: a software environment for sequence data. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>. [last accessed: 19 June 2000]. Technische Universität München, München

**Sullivan, J. P., D. Dickinson, H. A. Chase.** 1998. Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and their application to bioremediation [review]. *Critical Reviews in Microbiology* **24**: 335-373

**Swope, K. L., und M. C. Flickinger.** 1996. The use of confocal scanning laser microscopy and other tools to characterize *Escherichia coli* in a high-cell-density synthetic biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 340-356

**Thom, S. M., R. W. Horobin, E. Seidler, M. R. Barer.** 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *J. Appl. Bact.* **74**: 433-443

**Tsien, H. C., B. J. Bratina, K. Tsuji, R. S. Hanson.** 1990. Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2858-2865

- Tyler, S. C., R. S. Bilek, R. L. Sass, F. M. Fisher.** 1997. Methane oxidation and pathways of production in a Texas paddy field deduced from measurements of flux, delta C-13, and delta D of CH<sub>4</sub>. *Global Biogeochem. Cycles* **11**: 323-348
- van Bodegom, P. M..** 2000. Methane emissions from rice paddies; experiments and modelling. PhD thesis. Wageningen University, NL
- van der Geest, A. H. M., und J. F. Petolino.** 1998. Expression of a modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny. *Plant Cell Reports* **17**: 760-764
- van der Nat, F. J. W. A., J. F. C. de Brouwer, J. J. Middelburg, H. J. Laanbroek.** 1997. Spatial distribution and inhibition by ammonium of methane oxidation in intertidal freshwater marshes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4734-4740
- Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H. P. Koops, K. H. Schleifer.** 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **18**: 251-264
- Wahlen, M., N. Tanaka, R. Henry, B. Deck, J. Zeglen, J. S. Vogel, J. Southon, A. Shemesh, R. Fairbanks, W. Broeker.** 1989. Carbon-14 in methane sources and in atmospheric methane: the contribution from fossile carbon. *Science* **245**: 286-290
- Walsh, S., H. M. Lappin-Scott, H. Stockdale, B. N. Herbert.** 1995. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. *Journal of Microbiological Methods* **24**: 1-9
- Wassmann, R., H. Papen, H. Rennenberg.** 1993. Methane emission from rice paddies and possible mitigation strategies. *Chemosphere* **26**: 201-217
- Watanabe, A., T. Takeda, M. Kimura.** 1999. Evaluation of origins of CH<sub>4</sub> carbon emitted from rice paddies. *J. Geophys. Res.* **104**: 23623-23629
- Whittenbury, R., K. C. Philips, J. F. Wilkinson.** 1970. Enrichment, isolation, and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 205-218
- Whittenbury, R., S. L. Davies, J. F. Davey.** 1970. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 219-226
- Wise, M.G., J.V. McArthur, L.J. Shimkets.** 1999. Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture independent 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4887-4897
- Yamaguchi, N., und M. Nasu.** 1997. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 43-52
- Yu, K. W., Z. P. Wang, G. X. Chen.** 1997. Nitrous oxide and methane transport through rice plants. *Biol. Fert. Soils* **24**: 341-343
- Zhao, S.-J., und R. S. Hanson.** 1984. Variants of the obligate methanotrophic isolate 761M capable of growth on glucose in the absence of methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 807-812

## 7. Anhang 1

### **Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence *in situ* hybridisation**

Gundula Eller, Stephan Stubner and Peter Frenzel<sup>1</sup>

Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch-Strasse,  
35043 Marburg, Germany

#### **Abstract**

The study of methane oxidising bacteria (methanotrophs) is of special interest, because of their role in the natural reduction of methane emissions from many different sources. Therefore new probes were developed to detect specifically either type I (*Methylococcaceae*) or type II methanotrophs (*Methylo-cystaceae*). The probes showed high specificity in fluorescence *in situ* hybridisations (FISH), as demonstrated by parallel hybridisation of target and reference strains as well as sequence data analysis. With these probes, methanotrophs were detected in soil and root samples from rice microcosms, demonstrating their applicability even in a complex environmental matrix.

*Keywords:* group specific probes, methanotrophs, FISH

---

<sup>1</sup> corresponding author. Tel.: +49-(0)6421-178 820; Fax: +49-(0)6421-178 809;  
E-mail: [frenzel@mail.uni-marburg.de](mailto:frenzel@mail.uni-marburg.de)

## Introduction

During the last 200 years, the atmospheric concentration of the greenhouse gas CH<sub>4</sub> has steadily increased [1]. The anoxic soils of natural wetlands and flooded rice fields belong to the most important sources of atmospheric CH<sub>4</sub> [2]. However, only a fraction of the produced CH<sub>4</sub> will eventually be released into the atmosphere, because aerobic CH<sub>4</sub> oxidizing bacteria (methanotrophs) consume a significant part as carbon and energy source in these habitats [3]. Methanotrophs are classified into two families [4]: The *Methylococcaceae* (type I), belonging to the  $\gamma$ -proteobacteria and the *Methylocystaceae* (type II), belonging to the  $\alpha$ -proteobacteria. The family *Methylococcaceae* includes the genera *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera*, *Methylococcus* and *Methylocaldum*. The family *Methylocystaceae* includes the genera *Methylosinus* and *Methylocystis*.

In some previous studies [5-10], different techniques for the culture-independent detection of methanotrophs in environmental samples have been described. Among those, FISH is a promising tool, because it allows the detection and counting of bacterial cells directly in environmental samples. It is superior to serological methods, because it allows the design of group specific probes, hopefully targeting non-culturable organisms [11, 12]. Nevertheless, no strictly group-specific probes for methanotrophs are yet available (Table 1), even if the published ones have been used in some cases (e.g. [13]). Therefore we put special efforts into the design of probes, which hybridise specifically with methanotrophs, while not detecting methylotrophic bacteria, the non-target group most often associated with methanotrophs in natural habitats.

## Materials and Methods

### Design of oligonucleotide probes and adjustment of specificity

Using the ARB software package (database 1998, including about 13000 sequences) [14], the 16S rDNA sequences of the family *Methylococcaceae* (type I methanotrophs, including sequences of 20 strains) were scanned for conserved regions. The same procedure was done for the genera of type II methanotrophs (including sequences of 8 strains). The aim was to develop probes for the detection of as many strains of the respective type of methanotrophs as possible, but avoiding the parallel detection of non-methanotrophic organisms. The probe sequences were further checked by FASTA3 searches in the recent EMBL database. Probes were synthesized and labelled with the respective fluorochrome (Fluorescein (Fluos), Texas red, CY5) by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Their sequences are listed

in Table 2. The target sites given refer to the *Escherichia coli* (*E. coli*) numbering, according to Brosius *et al.* [15].

As a first step the hybridisation efficiency of all probes was estimated in comparison to the eubacterial probe Eub338 [16] by FISH. For this, both probes were labelled with the same fluorophore and hybridised with fixed pure culture cells in parallel samples. Differences in signal intensities between the new probes and Eub338 reflected the relative hybridisation efficiency.

For the optimization of the preselected probes, non-methanotrophic reference strains were hybridised in parallel to the target strains. These reference strains were selected by sequence analysis in ARB and had one or two mismatches to the probe sequence (Table 2). Additionally, for probes targeting type II methanotrophs we used a type I strain as further negative control for the specificity of hybridisation. The reverse procedure was applied to probes targeting type I methanotrophs. With the parallel hybridisation of all given target and the respective non-target strains, the stringency of the probes was optimized by adjusting the formamide concentration.

### **Cultivation of pure cultures**

Pure cultures of methanotrophs were obtained from the National Collection of Industrial, Food, and Marine Bacteria (NCIMB, Aberdeen, UK), if not otherwise indicated. Cultures of methanotrophs were incubated in NMS-medium [4] with 20% CH<sub>4</sub> (v/v) in the headspace, shaken at 120 rpm at 25°C in the dark, except for *Methylococcus capsulatus*, which was incubated at 37°C with 40% CH<sub>4</sub> (v/v) in the headspace. For the family *Methylococcaceae* (type I) the strains *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128), *Methyломicrobium album* (NCIMB 11123), *Methylobacter luteus* (subculture of NCIMB 11914, kindly provided by P. Bodelier, Netherlands Institute of Ecology, Centre for Limnology, Maarssen, NL), and *Methylococcus capsulatus* (subculture of NCIMB 11853, kindly provided by B. Bendinger, DVGW-Forschungsstelle, TU Hamburg-Harburg, Germany) were used. To adjust the type II probes, the strains *Methylosinus trichosporium* OB3b (NCIMB 11131), *Methylosinus sporium* (culture collection MPI Marburg, subculture of NCIMB 11126), and *Methylocystis parvus* (NCIMB 11129) were employed.

The non-methanotrophic reference strains used for the adjustment of the probes My84 and 705 (*Thiobacillus thiooxidans* (DSMZ 504)), and Mα450 and 464 (*Caulobacter crescentus* (DSMZ 4727)) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cellcultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) and grown under the conditions given by the provider.

## Sequencing

The identity of the type I methanotrophs was verified by partial sequencing of their 16S rDNA and comparison to EMBL and ARB sequence databases. DNA was extracted following the procedure described by Henckel *et al.* [17]. The 16S rDNA was amplified with the primerset 9/27f and 1492/1512r [18]. Sequencing was done with the ABI Prism™ Dye Terminator Ready Reaction kit on a 373 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt), using the 1100r primer. For a detailed description of the sequencing see Stubner *et al.* [19].

ARB and EMBL database comparison of the received partial sequences revealed, that all mentioned type I methanotroph strains, except *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB11128), belonged to the respective genera.

## Environmental samples

The hybridisation of the rhizoplane suspension of a 28 day old rice root is given as an example for the application of the probes to environmental samples. This sample was taken from an experiment with rice, grown in Italian rice field soil in a microcosm. For a description of the microcosms see Bodelier *et al.* [20]. The rhizospheric bacteria were extracted by shaking washed roots with glass beads ( $\varnothing$  1 mm) and autoclaved water for 30 min on a horizontal shaker at 180 rpm. The suspension was decanted and 1 ml was used for fixation as described below for pure cultures.

## Fixation

Pure cultures were harvested in the exponential growth phase by centrifugation (13000 x g, 8 min). Cell pellets were resuspended in 100 µl phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0) prior to the addition of 300 µl freshly prepared 4% paraformaldehyde (in PBS). Samples were left for 2 h at room temperature for fixation, before they were washed 5 times with PBS. Pellets were resuspended in ethanol : PBS (1:1) and stored at -20°C until hybridisation.

## Whole cell hybridisation

The hybridisation protocol used was described in detail by Aßmus *et al.* [21]. Prior to hybridisation, 1-2 µl of fixed pure culture suspensions (20 µl of fixed rhizoplane suspension) were transferred to 8well coated slides and left for drying at room temperature overnight. Autofluorescence in environmental samples was quenched with 10 µl of 0.01 % (w/v) toluidine blue 0 (Sigma, Germany) in PBS (pH 7.0) for 30 min at room temperature. After rinsing with distilled water, slides were washed in ethanol solutions and hybridised as described below.

The dried slides were washed in 50, 80, 96 % aqueous ethanol for 3 min each. Wells were covered with 8 µl hybridisation buffer (Tris 2.4 g l<sup>-1</sup>, SDS 2.0 g l<sup>-1</sup>, EDTA 2.0 g l<sup>-1</sup>, NaCl 0.9 M, pH 7.4, respective formamide amount added). To each well 1 µl probe solution (50 ng µl<sup>-1</sup>) was added and hybridisation was carried out for 1.5 h (pure cultures) to 2.5 h (environmental samples) at 46°C in a water saturated atmosphere chamber in a hybridisation oven (Hybaid, MWG-Biotech, Germany).

Unbound oligonucleotides were removed by rinsing the slides with 20 ml washing buffer (Tris 2.4 g l<sup>-1</sup>, SDS 2.0 g l<sup>-1</sup>, EDTA 2.0 g l<sup>-1</sup>, pH 7.4, NaCl corresponding to formamide concentration in hybridisation [22]), prewarmed to 48°C. Subsequently, the slides were incubated with 8 µl washing buffer per well for 20 min at 48°C. They were rinsed again with washing buffer, air dried and DNA-stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole (Sigma, Germany), 0.55 µM in distilled water) for 10 to 15 min at room temperature in the dark. Remaining DAPI-solution was removed by rinsing the slides with distilled water.

After air drying at room temperature, coverglasses were mounted with 2 µl Citifluor Antifading solution in PBS / glycerine (AF1, Citifluor Products, Citifluor Ltd., UK).

Slides were analysed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with a Leica DMR XE microscope, 63 x oil immersion lens, and TCS NT 1.6.582 software.

## Results

For the detection of **type II methanotrophs**, including the species *Methylosinus sporium*, *Methylosinus trichosporium*, and *Methylocystis parvus*, two probes were developed (Table 2). These probes differed in their 16S rRNA position and in the position of their two mismatches to the sequence of the methylotrophic organism *Hyphomicrobium vulgare* (X53182). These mismatches are important, because the methylotrophic *Hyphomicrobia* are often associated with methanotrophs and appear together with them in environmental samples [23].

In visual comparison of fluorescence intensity, the probe M $\alpha$ 450 showed higher signal intensities than the eubacterial probe Eub338 with the target strains, thus being especially useful for the detection of type II methanotrophs *in situ*. Probe M $\alpha$ 464 resulted in comparable signal intensities as Eub338. Both probes also showed a constant signal intensity in different cells of the same pure culture preparation.

The probes M $\alpha$ 450 and M $\alpha$ 464 were specific for type II methanotrophs at a formamide concentration of 20%, at which all three target strains used were detected. At this concentration no signal was detected for *Caulobacter crescentus*



cells (2 mismatches) and even the visual signal intensity of the target strain *Methylosinus trichosporium* (0 mismatches) had decreased.

For the detection of **type I methanotrophs** six probes were developed (Table 2). Sequence comparison showed that they differed in the number of type I genera theoretically detected. Probes M<sub>84</sub>, 705, 983 and 993 showed sequence identities to the target sites of all genera, whereas probe M<sub>669</sub> had 1 mismatch to *Methylomicrobium* and *Methylococcus* strains. Probe M<sub>1004</sub> showed identity to the target region of *Methylomicrobium* strains, but one or more mismatches to the sequences of other type I genera.

For the evaluation of probes targeting type I methanotrophs the strains *Methylobacter luteus*, *Methylomicrobium album*, and *Methylococcus capsulatus* were used as target organisms in FISH. The theoretical sequence identities of the probes to the respective target group were reflected by FISH, where only probes M<sub>84</sub> and M<sub>705</sub> gave comparable signal intensities with all type I methanotrophs used, except *Methylobacter whittenburyi* (see below). The probes M<sub>983</sub> and M<sub>993</sub> gave no or only very weak hybridisation signals, even if they had no mismatches to the target sequences. The one mismatch of probe M<sub>669</sub> to sequences of *Methylomicrobium album* and *Methylococcus capsulatus* was reflected in hybridisations, where only *Methylobacter luteus* gave a bright signal at 20% formamide. This probe might be suitable for the specific detection of *Methylobacter* and *Methylomonas*, but needs to be tested with more target strains of these genera. M<sub>1004</sub> might be further developed as a genus specific probe, as it showed a bright fluorescence only with cells of *Methylomicrobium album*.

None of these probes gave a hybridisation signal with the type II reference strain *Methylosinus trichosporium*.

For the detection of methanotrophs in environmental samples a bright probe signal is needed. As only probes M<sub>84</sub> and M<sub>705</sub> covered the whole group of type I methanotrophs they were further investigated. These probes alone resulted in less intense hybridisation signals than the probe Eub338, but parallel hybridisation with both probes (labelled with the same fluorophore) resulted in comparable intensities. Specific detection of methanotrophs was obtained at a concentration of 20% formamide in the hybridisation buffer.

The combination of probes M<sub>84</sub> and 705 (coupled to the same fluorophore) with M<sub>α450</sub> (marked with another fluorophore) allowed the parallel detection of type I and type II methanotrophs in a cell mixture (Figure 1).

The same probe combination was also applied to rice field soil and rice root samples, where both families of methanotrophs could successfully be detected. Figures 2 and 3 show examples for the detection of both types of methanotrophs in the rhizoplane of a 28 days old rice plant. The intensity profiles in Figure 2 illustrate, that it was possible to specifically detect both types of methanotrophs. The hybridisation signal could well be distinguished from non-specific autofluorescence of soil particles and plant fragments. No non-specific binding of the probes was observed. Due to the low cell numbers of both types of methanotrophs in that habitat the parallel detection of cells of both types in one image is an exception. The relative abundance of methanotrophs in comparison to DAPI stained prokaryotes is better reflected in Figure 3.

Type I specific probes were first tested with *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB1128) as positive target strain, but gave no signal with these cells. Surprisingly, this strain could be detected with type II specific probes (M $\alpha$ 450, M $\alpha$ 464), which had shown no signal with a non-methanotrophic reference strain with 2 mismatches to the target sequence (*Caulobacter crescentus*). However, the published sequence of *Methylobacter whittenburyi* (accession number X73772) has an insert at the type II probes target site. This implies more than 2 mismatches to the probe sequence. PCR-based assays with other primers also indicated, that this *Methylobacter whittenburyi* strain belongs to type II methanotrophs but not to type I (not shown). To verify the identity of this *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB1128) strain, a 710 bp long fragment of a 16S rDNA was sequenced (primer 1100r) and compared to the EMBL database. Surprisingly, this strain, directly obtained from the NCIMB, turned out to belong to the *Methylocystis* genera, thus being not a type I but a type II methanotroph.

## Discussion

Until now it was not possible to detect and differentiate the two types of methanotrophs in environmental samples by FISH. The probes described here detect more known strains of the respective target group than other previously published probes or primers. They also allow a direct detection of cells of the subgroups of methanotrophs in environmental samples, whereby it is possible to localize methanotrophs in their microenvironment, do cell counts and study population dynamics in different environments.

The type specific probes M $\alpha$ 450 and M $\gamma$ 84 + 705 showed comparable signal intensities to the Eub338 probe, thus being suitable for direct application to

environmental samples, even if these showed autofluorescence. The probes also showed a more constant signal intensity in cells of one pure culture preparation than did previously reported probes. This might be due to the overall higher signal intensity of the new probes, which allowed also the detection of less intense fluorescing cells.

The lower signal intensity of the probes M<sub>983</sub> and M<sub>993</sub> compared to the signal detected with the universal eubacterial probe Eub338 might have been due to the 16S rRNA target position, which for *E. coli* is known to show great variations in probe binding efficiency [24]. For *E. coli*-position 450 relatively good probe binding was reported, whereas the positions 980 to 1015 were less suitable for probe binding.

*Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128) is the type strain for this genus [25] and was therefore used in our experiments as target strain for type I targeting probes. As unexpected hybridisation results occurred with this strain, all type I methanotroph reference strains were partially sequenced and controlled for their identity. Only the *Methylobacter whittenburyi* (NCIMB 11128) turned out not to belong to the predicted genus, but to type II methanotrophs. This result illustrates the specificity of the probes for the two types of methanotrophs. Problems with the hybridisation of this strain were also reported by Bourne *et al.* [10], who found no signal with probes specifically designed to target *Methylobacter whittenburyi* sequences. Upon checking their stocks as far back as 1973 when the organism was deposited, NCIMB found that the same strain was present in all frozen and freeze-dried stocks. This organism has subsequently proved to be a strain of *Methylocystis* according to morphological analysis and 16s rRNA sequencing. This suggests that the wrong strain was originally deposited with NCIMB and possibly subsequently with other culture collections. NCIMB have been unable to obtain an authentic strain from any other source and thus have removed this strain from their catalogue (Peter N Green, NCIMB, personal communication 2000).

## Conclusions

The group specific probes (M<sub>450</sub>, M<sub>84</sub> and M<sub>705</sub>) allow the detection of both types of methanotrophs in cell mixtures and in natural samples by FISH. Due to their specificity and signal brightness in FISH these probes are superior to previously published probes. The group specific sequences of the new probes may also be used as primers for the PCR-based detection of the two families of methanotrophs, but have yet to be tested for this application. The combination of FISH and PCR-

based techniques followed by sequencing would allow a further characterisation of the methanotrophic community analysed.

### Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, FR1053) for financial support.

### References

- [1] Rasmussen, R.A., and Khallil, M.A.K. (1984) Atmospheric methane in the recent and ancient atmospheres: concentrations, trends, and interhemispheric gradient. *J. Geophys. Res.*, 89, 11599-11605
- [2] Minami, K., and Neue, H.-U. (1994) Rice paddies as a methane source. *Climatic Change*, 27, 13-26
- [3] Gilbert, B., and Frenzel, P. (1995) Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biol. Fert. Soils*, 20, 93-100
- [4] Bowman, J.P. (1999) The Methanotrophs – The families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: *The Prokaryotes* [online] (Dworkin, M., Ed.), Springer Verlag New York; <http://link.springer-ny.com> [last accessed: 19 June 2000]
- [5] Tsien, H.C., Bratina, B. J., Tsuji, K., Hanson, R.S. (1990) Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 9, 2858-2865
- [6] Brusseau, G.A., Bulygina, E.S., and Hanson, R.S. (1994) Phylogenetic analysis and development of probes for differentiating methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2, 626-636
- [7] Holmes, A.J., Owens, N.J.P., and Murrell, C. (1995) Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. *Microbiology* 141, 1947-1955
- [8] Ritchie, D.A., Edwards, C., McDonald, I.R., and Murrell, C. (1997) Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Global Change Biology* 3, 339-350
- [9] Calhoun, A. and King, G.M. (1998) Characterization of root-associated methanotrophs from three freshwater macrophytes: *Pontederia cordata*, *Sparganium eurycarpum*, and *Sagittaria latifolia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3, 1099-1105

- [10] Bourne, D.G., Holmes, A.J., Iversen, N., and Murrell, C. (2000) Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. *FEMS Microb. Ecol.* 31, 29-38
- [11] Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169
- [12] Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.P., Schleifer, K.H. (1995) *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 18, 251-265
- [13] Ghiorse, W.C., Miller, D.N., Sandoli, R.L., Siering, P.L. (1996) Applications of laser scanning microscopy for analysis of aquatic microhabitats. *Microscopy Research and Technique*, 33, 1, 73-88
- [14] Strunk, O. and Ludwig, W. (1996), posting date [online] ARB: a software environment for sequence data. Technische Universität München, Munich, Germany,. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>. [last accessed: 19 June 2000]
- [15] Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.H. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4801 - 4805
- [16] Amann, R.L., Binder, B. J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919 – 1925
- [17] Henckel, T., Friedrich, M., Conrad, R. (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5, 1980-1990
- [18] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England
- [19] Stubner, S., Wind, T., Conrad, R. (1998: ) Sulfur oxidation in rice field soil: Activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 569 - 578
- [20] Bodelier, P.L.E., Roslev, P., Henckel, T., Frenzel, P. (2000) Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403, 421 -424

- [21] Aßmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R., Hartmann, A. (1995) In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 61,3, 1013 - 1019
- [22] Aßmus, B. (1996) *In-situ* Detektion von Bakterien aus Boden- und Gewässerhabitaten mit spezifischen Markierungen sowie optischen und zytometrischen Methoden. Dissertation, Shaker Verlag Aachen, Germany
- [23] Hanson, R.S., Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. Microbiol. Rev. 60, 439 - 471
- [24] Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwißpl, I., Ludwig, W., Amann, R. (1998) Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol., 64,12, 4973-4982
- [25] Bowman, J.P., Sly, L.I., Nichols, P.D., Hayward, A.C. (1993) Revise taxonomy of the methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only group I methanotrophs. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 735 – 753

**Table 1: Examples of published probes for the detection of methanotrophs or methylotrophs**

Probe <sup>1)</sup>	Target group	Target site <sup>2)</sup>	Sequence	False-positive strains <sup>3)</sup>	False-negative strains <sup>4)</sup>
10 $\gamma$ [5]	RuMP <sup>5)</sup> methylotrophs, including type I methanotrophs	197-216	Probe: 3'-TTGCCCCCTAGAAGCCTGG-5' Target: 5'-AAGCGGGGGAUCUUCGGACC-3'	methylotrophs with ribulose monophosphate pathway, e.g. <i>Methylophilus methylotrophus</i>	
MG-64 [10]	Type I methanotrophs	64-84	Probe: 3'-CTTGCCATTTCGGAAGCC-5' Target: 5'-GAACGGUAAAYAGGCCUUCGG-3'	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> , <i>Ectothiorhodospira shaposhnik</i> , <i>Thiobacillus</i> sp.	<i>Methylomonas methanica</i> , <i>Methylomonas aurantiaca</i> , <i>Methylomicrobium pelagicum</i>
9 $\alpha$ [5]	Serine <sup>6)</sup> methylotrophs, including type II methanotrophs	142-159	Probe: 3'-CAAGCCTTATGAGTCCC-5' Target: 5'-GUUCGGAUAACUCAGGG-3'	methylotrophs with serine pathway, e.g. <i>Methylobacterium extorquens</i>	
MA-621 [10]	Type II methanotrophs	621-641	Probe: 3'-TTGGAGCCTTGACGGAAACT-5' Target: 5'-AACCUCGGAACUGCCUUUGA-3'	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> , <i>Rhodobium orientis</i> , <i>Caulobacter bacteroides</i> , <i>Agrobacterium stellulatum</i> , <i>Prostethomicrobium pneumaticum</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Brevundimonas bacteroides</i> , <i>Pedomicrobium manganicum</i>	<i>Methylocystis pyriformis</i>

<sup>1)</sup> References given in brackets; <sup>2)</sup> Target site according to *E. coli* [15]; <sup>3)</sup> false positive when used for methanotrophs, as given by the authors; <sup>4)</sup> methanotrophs with 1 or more mismatches to the probe sequence; <sup>5)</sup> Methylotrophs using the ribulose monophosphate pathway for formaldehyde fixation; <sup>6)</sup> Methylotrophs using the serine pathway for formaldehyde fixation

Table 2: Group specific probes targeting type I and type II methanotrophs

Probe	Target group	Target site <sup>1)</sup>	% Formamide in FISH	Reference strains for stringency adjustment <sup>2)</sup>	Probe and target sequence
Mα450 <sup>3)</sup>	Type II methanotrophs	450 - 470	20%	<i>Caulobacter crescentus</i> (2)	Probe: 3'-CTATTACTGCCATGGACCTA-5' Target: 5'-GAUAAUGACGGUACCUGGAU-3'
Mα 464	Type II methanotrophs	464 - 484	20%	<i>Caulobacter crescentus</i> (2)	Probe: 3'-ATTACTGCCATGGACCTATT-5' Target: 5'-UAAUGACGGUACCUGGAUAA-3'
Mγ84 <sup>3)</sup>	Type I methanotrophs	84 - 103	20%	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2)	Probe: 3'-AGCCCGCGACTGCTCACC-5' Target: 5'-UCGGGCGCUGACGAGUGG-3'
Mγ705 <sup>3)</sup>	Type I methanotrophs	705 - 724	20%	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2)	Probe: 3'-CTAGAGTTCCTTGTTGGTC-5' Target: 5'-GAUCUGAAGGAACACCAG-3'
Mγ669	<i>Methylobacter</i> and <i>Methylomonas</i>	669 - 690	20%	<i>Methylobacterium album</i> (1), <i>Methylococcus capsulatus</i> (1)	Probe: 3'-CTCACCTTAAAGTCCACATCG-5' Target: 5'-GAGUGGAAUUCAGGUGUAGC-3'
Mγ1004	<i>Methylobacterium</i>	1004 - 1022	0%	<i>Methylobacter luteus</i> (4) <i>Methylococcus capsulatus</i> (>4)	Probe: 3'-TTAGACACTCTCTAGCAT-5' Target: 5'-AAUCUGUGAGAGAUCCGUA-3'
Mγ983	Type I methanotrophs	983 - 1001	n.d. <sup>4)</sup>	n.d.	Probe: 3'-TGGATGGGAAGTGTAGGT-5' Target: 5'-ACCUACCCUUGACAUCCA-3'
Mγ993	Type I methanotrophs	993 - 1011	n.d.	n.d.	Probe: 3'-CTGTAGGTCTCTTAGACA-5' Target: 5'-GACAUCCAGAGAAUCUGU-3'

<sup>1)</sup> Target site according to *E. coli* [15]; <sup>2)</sup> Numbers in brackets indicate the number of mismatches to the probe sequence; <sup>3)</sup> These probes showed no mismatches to the sequences given as examples below as well as to other not mentioned methanotrophs:

Mα450: *Methylosinus trichosporium* (M29024), *Methylosinus sporium* (M95665), *Methylosinus* sp. (M95663 and M95664), "*Methylocystis minimus*" (L20844), *Methylocystis echinoides* (L20848), *Methylocystis parvus* (Y18945 and AF150805), "*Methylosporovibrio methanica*" (M29025)



- Mγ84: *Methylobacter whittenburyi* (X72773), *Methylobacter luteus* (M95657), "*Methylobacter vinelandii*" (L20841), "*Methylobacter bovis*" (L20839), "*Methylomonas lutea*" (X72772), *Methylomicrobium album* (X72777), *Methylomicrobium agile* (X72767), *Methylomonas fodinarum* (X72778), *Methylomonas aurantiaca* (X72776), "*Methylobacter capsulatus*" (L20843), *Methylococcus capsulatus* (X72770 and X72771), *Methylococcus* sp. (X72769), *Ectothiorhodospira shaposhnik* (M59151, false positive)
- Mγ705: *Methylobacter whittenburyi* (X72773), *Methylobacter luteus* (M95657), "*Methylomonas lutea*" (X72772), *Methylomicrobium album* (X72777), *Methylomicrobium agile* (X72767), *Methylomicrobium pelagicum* (X72775), *Methylomonas methanica* (L20840 and AF150806), *Methylomonas* sp. (L20846), "*Methylomonas rubra*" (M95662), *Methylomonas fodinarum* (X72778), *Methylomonas aurantiaca* (X72776), *Methylococcus capsulatus* (X72770 and X72771), *Methylococcus* sp. (X72769), *Methylosphaera hansonii* (U77533 and U67929), unidentified mussel methanotroph (U29164), methanotrophic symbiont (U05595)

<sup>4)</sup> n.d. not determined

### Figure legends

**Figure 1: Mixture of target and non-target cells hybridised with probes specific for methanotrophs (M $\alpha$ 450 and M $\gamma$ 84/705) in parallel to the universal eubacterial probe (Eub338).** This mixture contained fixed cells of the strains *Methylobacter luteus*, *Caulobacter crescentus*, *Methylosinus trichosporium* and *Thiobacillus thiooxidans*. The picture shows the parallel detection of all three fluorophores. Probe M $\alpha$ 450 was marked with Texas red, M $\gamma$ 84 and 705 with Fluos (green) and Eub338 with CY5 (blue). Cells of methanotrophs hybridized as well with the specific as with the universal probe and showed up as pink (type II) or turquoise (type I) cells. The reference cells hybridized only with the eubacterial probe and showed blue colour.

**Figure 2: Specific detection of the two types of methanotrophs by FISH in a rhizoplane sample of a 28 day old rice microcosm.**

**Figure 2a:** Overlay picture of three channels, with probe M $\alpha$ 450 marked Texas red, M $\gamma$ 84/705 both marked Fluos (green) and DNA stain DAPI (blue). The type I methanotroph cell hybridized with the green probes and is DAPI positive, thus appearing turquoise, whereas the type II cell hybridised with the red marked probe and is DAPI stained, thus appearing pink. Only DAPI positive cells are blue.

**Figure 2 b:** Intensity profile of fluorophores of the type I cell, showing high signal intensities for the type I probe and DAPI. The signal of the type II probe was significantly less intense. The intensity (y-axis) is given in arbitrary units.

**Figure 2 c:** Intensity profile of the type II cell, showing the probe specificity by their difference in relative fluorescence intensity; legend as in Fig. 2b.

**Figure 2 d:** Autofluorescence in the sample can easily be distinguished from specific signals by comparing intensity profiles or resulting colour in the overlay: The signal intensities for green and red channel were high, but no DAPI signal and no bacterial shape could be detected; legend as in Fig. 2b.

**Figure 3: Specific detection of type I methanotrophs in an environmental sample by FISH, showing their relatively low cell number compared to overall DAPI counts.** A rhizoplane sample of a 28 day old rice microcosm was hybridized with the probes M $\alpha$ 450 (Texas red) and M $\gamma$ 84/705 (Fluos, green), as well as DAPI-stained (blue). The arrow marks a type I methanotroph.

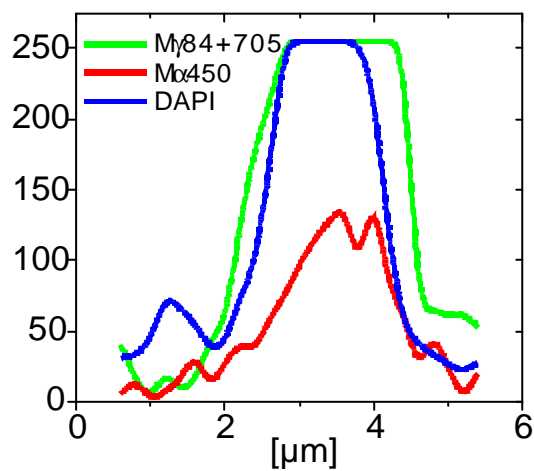
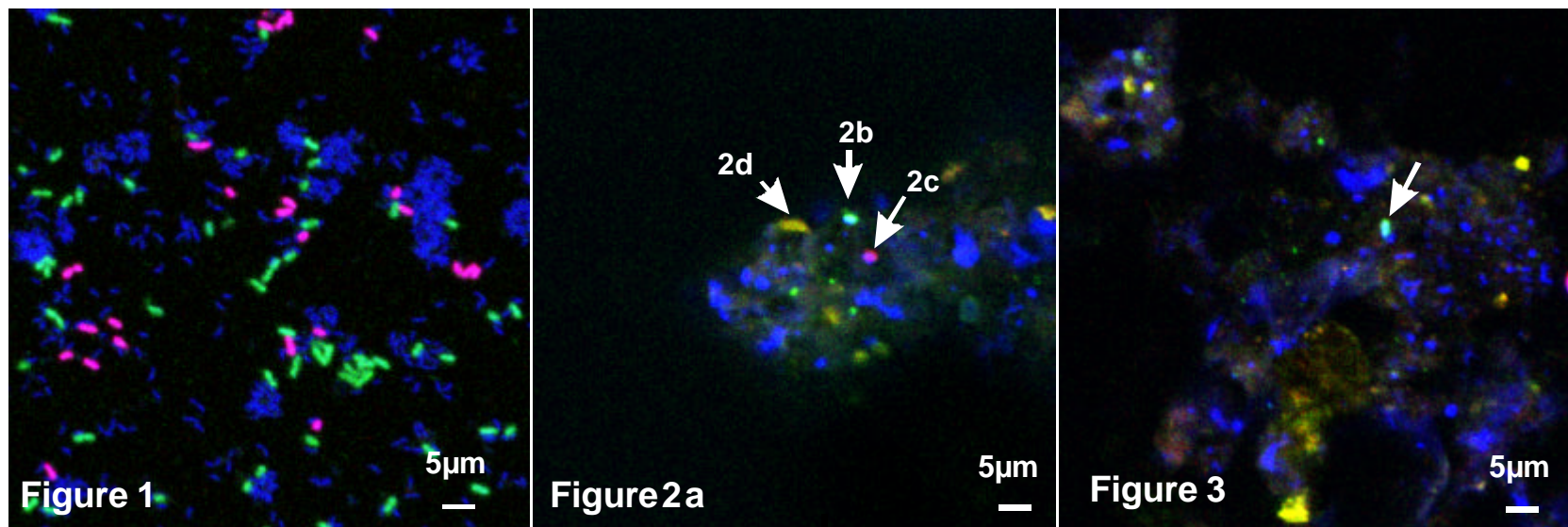


Figure 2b

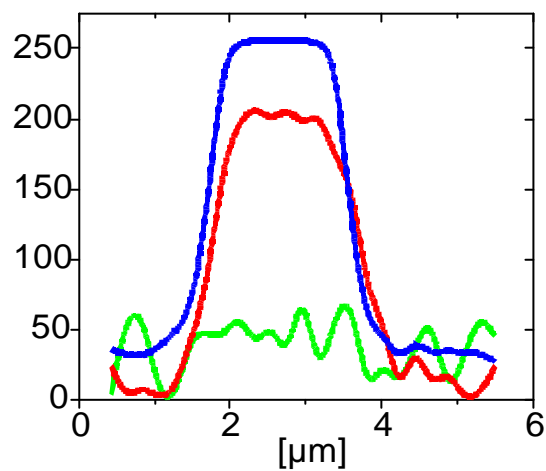


Figure 2c

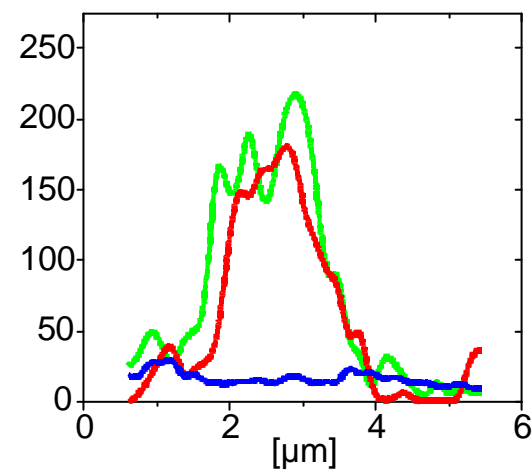


Figure 2d

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Diese Versicherung schliesst Zeichnungen und Skizzen mit ein.

Diese Dissertation wurde in der jetztigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Gundula Eller

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Peter Frenzel möchte ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Begleitung und stete Diskussionsbereitschaft danken. Durch sein Vertrauen und seine Anregungen war es mir möglich, meine Promotion mit viel Freiraum und Freude zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. W. Buckel möchte ich für die Begutachtung der Arbeit danken.

Besonders möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Ralf Conrad für die gute Zusammenarbeit und hilfreiche Diskussionen danken.

Ebenso danke ich Dr. Paul L. E. Bodelier für die freundliche Unterstützung und so manche Hilfe mit den Mikrokosmen.

Dr. Stefan Stubner sei für die gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung ins CLSM gedankt.

Herzlichen Dank an Alexandra Hahn für so manche Analyse und an Bianca Wagner, ohne die mein Einstieg in die Molekularbiologie schwieriger und weniger nett gewesen wäre.

Der gesamten Abteilung Conrad gilt mein Dankeschön für das gute Arbeitsklima.

Meiner Familie möchte ich für die unermüdliche Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit und den Verzicht auf so manche Stunde mit mir danken.

Vor allem aber gilt mein Dank Martin Krüger, der mich nicht nur in Italien unterstützte, sondern mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und auch meine zeitweise schlechte Laune ertrug.

## Lebenslauf

Gundula Eller, geboren am 21.10.1969 in Rahden, Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulbildung:** Grundschule: 1976 bis 1980, Espelkamp

Gymnasium: 1980 bis 1989, Espelkamp, Abitur Mai 1989

**Studium:** Studiengang Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig

Beginn: Wintersemester 1989/90

Vordiplom: 31.3.1992

Studienarbeit: Dezember 1993 bis Februar 1994

Titel: Laccase-Produktion in Strohkulturen verschiedener Weissfäulepilze

Diplomarbeit: Februar bis Dezember 1995

Titel: Liquid composting of raw wastewater, mixed with biodegradable waste. Persistence of selected pathogens and indicator organisms

Diplom: 10. Januar 1996

**Dissertation:** Januar 1998 bis Januar 2001 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg unter der Leitung von PD Dr. Peter Frenzel über "Aktivität, Populationsdynamik und Diversität Methan oxidierender Bakterien im Reisfeld"

### Auslandsaufenthalte und sonstige Tätigkeiten

Februar bis Mai 1994: Praktikum bei der Stiftung Europäisches Naturerbe in Brüssel.  
Anfertigung einer Studie zur "Entwicklung der Agrarstrukturen in der Europäischen Union"

Februar bis November 1995: Anfertigung der Diplomarbeit in Schweden an folgenden Instituten: Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm; Swedish Institute of Agricultural Engineering, Uppsala und National Institute for Veterinary Medicine, Uppsala

März 1996 bis Dezember 1997: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig. Durchführung und Betreuung von Untersuchungen einer on-site Sanierung von mit BTEX und PAK verunreinigtem Grundwasser an einem ehemaligen Gaswerksstandort

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Eller, G., S. Stubner, P. Frenzel (2000) *Group specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation*. FEMS Letters, akzeptiert September 2000

Eller, G. und P. Frenzel (2000) *Changes in activity and community structure of methane oxidising bacteria over the vegetation period of rice*. Appl. Environm. Microbiol., eingereicht Oktober 2000

Lang, E., G. Eller, F. Zadrazil (1997) *Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms*. Microbial Ecology 34: 1-10, Springer-Verlag New York Inc.

Eller, G., E. Norin, T.-A. Stenström (1996) *Aerobic thermophilic treatment of blackwater, mixed with organic waste and liquid manure: Persistence of selected pathogens and indicator organisms*. Environmental Research Forum Vols. 5-6: 355-358, Transtec Publications, Switzerland